



Leucémie lymphoïde chronique : étude des marqueurs du pronostic et de l'instabilité génomique

Lauren Veronese

► To cite this version:

Lauren Veronese. Leucémie lymphoïde chronique : étude des marqueurs du pronostic et de l'instabilité génomique. Biologie moléculaire. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2013. Français. NNT : 2013CLF1MM09 . tel-01166355

HAL Id: tel-01166355

<https://theses.hal.science/tel-01166355>

Submitted on 22 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**
N° d'ordre

THESE

Présentée à l'Université d'Auvergne
Pour l'obtention du grade de **DOCTEUR** (décret du 5 juillet 1984)
Spécialité : Cytogénétique et Biologie Moléculaires

Soutenue le 6 septembre 2013

Lauren VERONESE

**Leucémie Lymphoïde Chronique :
Etude des Marqueurs du Pronostic et de l'Instabilité Génomique**

Président : Mr le Professeur Olivier Tournilhac

Rapporteurs : Mr le Professeur Thierry Lavabre-Bertrand
Mr le Professeur Jean-Philippe Merlio

Membres : Mme le Docteur Mary Callanan, Examineur
Mr le Professeur Philippe Vago, Co-Directeur de Thèse
Mr le Professeur Andreï Tchirkov, Directeur de Thèse

Service de Cytogénétique Médicale du CHU Estaing
Département de Cytologie Histologie Embryologie Cytogénétique de la Faculté de Médecine
EA 4677 ERTICa « Equipe de Recherche sur le Traitement Individualisé du Cancer »
En collaboration avec EA 7283 CREaT « Cancer Resistance Exploring and Targeting »

RESUME

La leucémie lymphoïde chronique (LLC), hémopathie lymphoïde fréquente, se caractérise par une évolution clinique extrêmement variable. Bien que les marqueurs de pronostic soient nombreux dans la LLC, aucun n'est univoque. Dans ce contexte, identifier de nouveaux facteurs prédictifs et comprendre la pathophysiologie de marqueurs pronostiques déjà établis constituent deux objectifs importants pour améliorer la prise en charge thérapeutique de cette hémopathie.

Nous avons tout d'abord choisi d'étudier la valeur pronostique et les mécanismes de régulation de l'expression du gène anti-apoptotique *MCL1*. Nous avons montré que l'expression de *MCL1* est un marqueur prédictif de la survie globale parmi l'ensemble des patients et parmi les stades précoces ; ce marqueur est également prédictif de la survie sans traitement des patients en stade A. Ainsi, l'expression de *MCL1* permet d'identifier précocement les formes de LLC à haut risque et faible risque d'évolution défavorable. Nous avons également démontré que l'expression de *MCL1* est fortement corrélée à l'expression de *VEGF*, confirmant le rôle de cette voie de signalisation dans la survie des lymphocytes tumoraux et suggérant que VEGF pourrait réguler positivement l'expression de *MCL1* selon un mode autocrine.

Nous avons ensuite exploré la fonction télomérique en rapport avec les anomalies chromosomiques à valeur pronostique, reflets de l'instabilité génomique. Notre travail a contribué à démontrer la relation entre l'instabilité génomique et le statut télomérique, évalué par la longueur des télomères et l'expression de *hTERT* et des gènes du complexe shelterin. Nous avons ainsi mis en évidence trois groupes de patients présentant des profils cytogénétiques et télomériques distincts : le premier groupe combine une cytogénétique favorable, des télomères longs, une expression faible ou absente de *hTERT* et une expression forte des gènes du complexe shelterin ; le troisième groupe se caractérise par de multiples aberrations chromosomiques (notamment délétions 17p et 11q), une augmentation de l'expression de *hTERT* et une diminution de la longueur des télomères et des niveaux d'expression de *TRF1*, *TRF2* et *POT1* ; le deuxième groupe est intermédiaire. Ces résultats confirment l'existence d'un lien entre statut télomérique et instabilité génomique au cours de la LLC et soulignent le rôle de la perte de *TP53* ou *ATM* dans cette dysfonction télomérique. L'altération du statut télomérique est par ailleurs associée à des caractéristiques de pronostic défavorable, comme l'absence de mutation des IgV_H, l'expression de CD38 et le doublement rapide de la lymphocytose.

Enfin, nous avons évalué l'intérêt de la technique de MLPA pour la mise en évidence des anomalies cytogénétiques récurrentes à valeur pronostique de la LLC. Nous avons montré qu'il existe une bonne concordance entre la technique de référence et la MLPA, qui constitue une approche rapide et peu coûteuse pour la recherche d'anomalies génomiques présentes dans une majorité de cellules malignes. Nous avons cependant mis en évidence des cas intéressants de faux-positifs et de faux-négatifs avec la MLPA, indiquant que cette méthode ne peut pas remplacer les techniques classiques, mais constitue une approche complémentaire permettant une évaluation simultanée de divers déséquilibres.

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a frequent lymphoid hemopathy characterized by an extremely variable clinical course. Although there are numerous prognostic markers in CLL, none is univocal. In this context, identifying new predictive factors and understanding the pathophysiology of previously established prognostic markers represent two important aims to improve therapeutic management of this hemopathy.

We first chose to study the prognostic value and mechanisms of regulation of anti-apoptotic *MCL1* gene expression. We showed that *MCL1* expression is a predictive marker of overall survival within the whole patient cohort and among early stages; this marker is also a predictor of treatment free survival of stage A patients. Thus, *MCL1* expression allows early identification of CLL forms with high risk and low risk of unfavourable evolution. We also demonstrated that *MCL1* expression is strongly correlated to *VEGF* expression, confirming the role of this signalling pathway in tumour lymphocytes survival and suggesting that *VEGF* may be a positive autocrine regulator of *MCL1* expression.

We then explored telomeric function regarding prognosis-related chromosomal anomalies, reflecting genomic instability. Our work contributed to demonstrate the relationship between genomic instability and telomeric status, evaluated by telomere length and expression of *hTERT* and shelterin complex genes. We described three groups of patients with distinct cytogenetic and telomeric profile: first group combines good-prognosis cytogenetics, long telomeres, low or negative *hTERT* expression and high expression of the shelterin complex genes; third group displays multiple chromosome aberrations (particularly 17p and 11q deletions), increased *hTERT* expression and decreased telomere length and *TRF1*, *TRF2* and *POT1* expression levels; second group is intermediate. These results confirm the relationship between telomeric status and genomic instability in CLL and underline the role of *TP53* or *ATM* loss in this telomeric dysfunction. The alteration of telomeric status is also associated with poor-prognosis features, such as unmutated IgVH, CD38 expression and rapid lymphocytosis doubling time.

Finally, we evaluated the contribution of MLPA approach for detection of recurrent prognosis-related cytogenetic anomalies. We found a good concordance between the gold-standard technique and MLPA, which represent a time and cost-effective approach for the detection of genomic aberrations affecting most malignant cells. We however described interesting MLPA false-positive and false-negative cases, indicating that this method may not replace classic techniques, but may constitute a complementary approach allowing simultaneous evaluation of various imbalances.

REMERCIEMENTS

Un grand merci à Mr Merlio et Mr Lavabre-Bertrand, rapporteurs, ainsi qu'à Mme Callanan, examinatrice, pour leur examen critique de ce travail

Merci à Mr Vago, pour m'avoir offert l'opportunité de travailler dans cette discipline qui me plaît tant

Merci à Andrei, pour ton aide ineffable ; bien sûr, sans toi, il n'y aurait pas de thèse... je voudrais exprimer mon estime pour tes compétences médicales et scientifiques, ainsi que ma reconnaissance pour le temps que tu m'as accordé, pour ton soutien, pour tes conseils toujours justes (même en terme de séries télévisées !), pour ta gentillesse et surtout, surtout, pour ta patience !

Merci à Olivier, cher Président de ce jury : sois assuré de mon profond respect et de mon admiration inconditionnelle

REMERCIEMENTS

Merci à la Ligue Contre le Cancer pour avoir soutenu ce travail de Doctorat

Merci à tous les cliniciens qui ont fourni des échantillons et des données cliniques ; merci à leurs patients qui ont consenti à leur utilisation ; merci aux cytologistes et aux « cytométristes » pour leur résultats ; merci à Mary pour son analyse des statuts mutationnels

Merci au Pr Jean Louis Kemeny et au Dr Claude Darcha pour notre petit trafic d'amygdales

Merci à Bernard Perissel pour m'avoir initié à la Cytogénétique Hématologique

Merci à toute l'équipe des techniciennes, qui ont plus que largement contribué à cette thèse : Farida, Marine, Estelle, Corinne, Christine, Delphine, Mylène, Aurélie, Cathy, Caro, Alex, Nathalie, Florence... Merci aussi à Cyrille et Cristina

Un grand merci à Patricia pour son aide si précieuse (pour ce travail et pour tout le reste....)

Merci à toute la bande de Cytogénétique avec qui je partage de très grands moments de rigolade (Carole, promis, tu l'auras ta statue !), des vanes totalement « décalées » et des apéros au Dérailleur... : Carole, Céline, Nolwen, Laetitia, Mathilde (qui m'apprend de bien jolies chansons entre 2 PCR), Gwendoline, Stéphan, Léo, Mélanie... Bien sûr, sans vous pour me distraire, j'aurais soutenu cette thèse bien plus tôt !-)

Merci à toute ma famille que j'adore

... Merci à Guillaume, Marius, Séléné et Camille ♥

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	19
-----------------------------	----

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	27
------------------------------------	----

I- DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	33
---	-----------

<u>1. LA LEUCEMIE LYMPHOIDE CHRONIQUE (LLC)</u>	35
--	-----------

1.1 Définition.....	35
1.2. Incidence – Prévalence.....	35
1.3. Facteurs de risque.....	35
1.4 Facteurs de pronostic : Article 1 (en annexe)	37
1.4.1. Classifications clinico-biologiques.....	37
1.4.2. Marqueurs biologiques « classiques »	39
1.4.3. Marqueurs biologiques « récents ».....	39
1.4.4. Evaluation de la maladie résiduelle (MRD)	43
1.4.5. Facteurs pronostiques en cours d'évaluation.....	43
1.4.6. Place dans la prise en charge thérapeutique.....	45
1.5. Principes de traitement.....	47

<u>2. DONNEES PHYSIOPATHOLOGIQUES.....</u>	51
---	-----------

2.1. Origine cellulaire de la LLC.....	51
2.2. Rôle de la stimulation antigénique du BCR.....	53
2.3. Résistance à l'apoptose.....	57
2.3.1. Voies de l'apoptose.....	57
2.3.2. Membre de la famille BCL2.....	59
2.3.3. Apoptose chimio-induite.....	61
2.4. Prolifération.....	61
2.5. Rôle du microenvironnement.....	63
2.6. Anomalies génétiques au cours de la LLC.....	65
2.6.1. Anomalies chromosomiques.....	65
2.6.2. Phénomènes mutationnels.....	65
2.6.3. Longueur des télomères.....	67
2.7. Conclusion.....	69

<u>3. ROLES DES GENES ANTI-APOPTOTIQUES <i>MCL1</i>, <i>IL6</i> ET <i>VEGF</i></u>.....	71
--	-----------

3.1. Myeloid-Cell-Leukemia-1 (<i>MCL1</i>).....	71
3.1.1. Gène et protéine <i>MCL1</i>	71
3.1.2. Mécanismes de régulation de l'expression de <i>MCL1</i>	73

3.1.3. Expression de <i>MCL1</i> au cours de la LLC.....	75
3.2. Interleukine-6 (<i>IL6</i>).....	77
3.2.1. Gène et protéine <i>IL6</i>	77
3.2.2. Transduction du signal induit par l' <i>IL6</i>	79
3.2.3. Mécanisme d'action de l' <i>IL6</i> et régulation du gène <i>MCL1</i>	81
3.2.4. Expression d' <i>IL6</i> dans les pathologies tumorales : données cliniques...	83
3.2.5. Expression d' <i>IL6</i> dans la LLC : données cliniques.....	85
3.3. Vascular Endothelial Growth Factor (<i>VEGF</i>).....	87
3.3.1. Gène et protéine VEGF.....	87
3.3.2. Transduction du signal induit par VEGF.....	87
3.3.3. Mécanismes d'action de VEGF et régulation du gène <i>MCL1</i>	89
3.3.4. Expression de VEGF dans les pathologies tumorales : données cliniques....	91
3.3.5. Expression de VEGF dans la LLC : données cliniques.....	91
 <u>4. TELOMERES ET INSTABILITE GENOMIQUE.....</u>	 95
4.1. Définition et fonctions des télomères.....	95
4.2. Structure des télomères.....	97
4.2.1. Séquences répétées.....	97
4.2.2. Complexe shelterin ou télosome.....	97
▪ Organisation générale du complexe shelterin.....	97
▪ Structure des protéines du complexe shelterin.....	99
▪ Fonction du complexe shelterin.....	103
4.2.3. Protéines télomériques accessoires : rôle de la protéine ATM.....	103
4.3. Réplication terminale, raccourcissement des télomères et vieillissement.....	107
4.4. Télomérase et régulation de la longueur des télomères.....	109
4.5. Télomères et instabilité génomique : hypothèse télomérique du cancer.....	111
4.6. Télomères et LLC.....	113
4.6.1. Valeur pronostique du couple télomères-télomérase.....	113
4.6.2. Dysfonction télomérique et instabilité génomique.....	115
 <u>5. ANOMALIES GENOMIQUES.....</u>	 121
5.1. Cytogénétique conventionnelle et moléculaire.....	121
5.1.1. Données générales.....	121
5.1.2. Principales anomalies récurrentes.....	121
▪ Délétion 13q.....	121
▪ Trisomie 12.....	125
▪ Délétion 11q.....	125
▪ Délétion 17p.....	127
5.1.3. Autres anomalies chromosomiques.....	129
▪ Anomalies déséquilibrées.....	129
▪ Translocations réciproques.....	129
▪ Caryotypes complexes et évolutions clonales.....	129

5.2. Mutations somatiques	133
5.2.1. Mutations du gène <i>TP53</i>	133
5.2.1.1. Structure du gène et de la protéine p53.....	133
5.2.1.2. Régulation de l'expression de p53.....	135
5.2.1.3. Rôle de p53.....	135
5.2.1.3.1. Données générales.....	135
5.2.1.3.2. Contrôle du cycle cellulaire.....	139
5.2.1.3.3. Apoptose.....	139
5.2.1.3.4. Autres fonctions.....	141
5.2.1.4. Inactivation de p53 au cours de la LLC.....	141
5.2.1.5. Fréquence et conséquences cliniques des mutations <i>TP53</i> au cours de la LLC.....	143
5.2.2. Mutations du gène <i>ATM</i>	147
5.2.3. Nouvelles mutations.....	149
▪ Mutations du gène <i>BIRC3</i>	149
▪ Mutations du gène <i>NOTCH1</i>	151
▪ Mutations du gène <i>SF3B1</i>	153
▪ Mutations du gène <i>MYD88</i>	155
▪ Autres mutations.....	155

II- OBJECTIFS	159
----------------------------	-----

III- RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	163
---	-----

1. VALEUR PRONOSTIQUE ET MECANISMES MOLECULAIRES DE L'EXPRESSION DE <i>MCL1</i>	165
Article 2.....	165
Article 3.....	171
2. TELOMERES ET INSTABILITE GENOMIQUE	179
Article 4.....	179
3. PLACE DE LA MLPA DANS L'ETUDE DES ANOMALIES CYTOGENETIQUES A VALEUR PRONOSTIQUE DE LA LLC	189
Article 5.....	189
4. TRAVAUX EN COURS	205

IV- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	211
---	------------

V- RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	239
--	------------

VI- ANNEXES.....	295
-------------------------	------------

1. ARTICLE PUBLIE DANS LE CADRE DE LA THESE.....	297
Article 1.....	297

2. AUTRE ARTICLE PUBLIE DANS LE DOMAINE DE LA LLC.....	313
Article 6.....	313

3. AUTRES ARTICLES EN CYTOGENETIQUE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE ONCO-HEMATOLOGIQUE.....	327
Article 7.....	327
Article 8.....	335
Article 9.....	345
Article 10.....	379

4. PRINCIPE DE LA MLPA.....	393
------------------------------------	------------

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ADN	Acide désoxyribonucléique
APAF	Apoptotic peptidase activating factor
APRIL	A proliferation inducing ligand (= TNFSF13A)
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related

B

BAD	BCL2/BCL-X _L -antagonist, causing cell death
BAK	BCL2-antagonist/killer 1
BAX	BCL2-associated X protein
BCL2	B-Cell leukaemia / lymphoma 2
BCLXL	BCL2-like 1 (= BCL2L1)
BCOR	BCL6 corepressor
BCR	B cell receptor
BH	Homologie à BCL2
BID	BH3 interacting domain death agonist
BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3
B2M	β-2-microglobuline
BRCA1	Breast cancer 1

C

CD	Cluster de Différenciation
CDC2/CDK1	Cyclin-dependent kinase 1
CGH	Comparative Genomic Hybridization (=ACPA Analyse Chromosomique sur Puce à ADN)
CHD2	Cadherin 2
CHK2	Checkpoint kinase 2
CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4

D

DDX3X	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked
-------	--

E

ERCC1	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1
ECCR4	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4 (= XPF)
EGR2	Early growth response 2
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase

F

FAS	Fas cell surface death receptor
FBX4	F-box protein 4
FBXW7	F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase
FEN1	Flap structure-specific endonuclease 1
FISH	Fluorescent in situ hybridization

G

GADD45	Growth Arrest & DNA Damage
GNL3L	Guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)-like

H

HIST1H1E	Histone cluster 1, H1e
hTERC	Human telomerase RNA Component
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase

I

IARC	International agency for research on cancer
IgV _H	Région variable du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines
IL6	Interleukin 6
IL6	Interleukin 6 receptor
ITPK	Inositol-tetrakisphosphate 1-kinase
IWCLL	International workshop on chronic lymphocytic leukemia

J

JAK	Janus kinase
-----	--------------

K

KLHL6	Kelch-like protein 6
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
kb	Kilobase

L

LDH	Lactico-déshydrogénase
LLC	Leucémie lymphoïde chronique

M

MAPK	Mitogen activated protein kinase
MBL	Monoclonal B-cell lymphocytosis
MCL1	Myeloid Cell Leukemia 1
MDM2	Murine double minute 2
MCPH1	Microcephalin 1
MED12	Mediator complex subunit 12
MEK	MAP/ERK kinase
MNDA	Myeloid Nuclear Differentiation Antigen
MDM-2	Murine double minute 2
MRD	Minimal residual disease
MRE11A	Meiotic recombination 11 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
MTOR	Mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene 88

N	
NBS1	Nibrin (=NBN)
NHEJ	Non homologous end joining
NOTCH1	Notch1
NOXA	NADPH oxidase activator
NRAS	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
O	
ORC	Origin recognition complex
OS	Overall survival
P	
p	Bras court
Pb	Paire de base
PDGF	Platelet derived growth factor
PEST	Proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T)
PFS	Progression-free survival
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PIN1	Peptidylprolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting 1
PINX1	PIN2/TERF1 interacting, telomerase inhibitor 1
PKC	Protéine kinase C
PLC γ	Phospholipase C γ
PKB/AKT	Protéine kinase B
PNUTS	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 10 (=PPP1R10)
POT1	Protection of telomeres 1
p-STAT3	Phospho-STAT3
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
Q	
q	Bras long
R	
RAP1	Repressor/Activator Protein 1
RB1	Retinoblastoma 1
RIPK	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
S	
SAMHD1	SAM domain and HD domain 1
SF3B1	Splicing factor 3b, subunit 1
SOS	Son of sevenless
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SYK	Spleen tyrosine kinase

T

TCL1	T-cell leukemia/lymphoma 1
TERRA	Telomeric repeat containing RNA
TIF	Telomere dysfunction induced foci
TIN2	TRF1 interacting Nuclear protein 2
TPA	12-O-tétradécanoyl-phorbol 13-acétate
TNF	Tumor necrosis factor
TP53	Tumour protein p53
TPP1	TIN2 and POT1 interacting Protein
TRAP	Telomeric Repeat Amplification Protocol
TRF1-TRF2	Telomeric repeat binding factor 1 et 2
TRFH	Domaine d'homologie à TRF
TYK	Tyrosine kinase 2

W

WRN	Werner syndrome, RecQ helicase-like
-----	-------------------------------------

X

XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
XPO1	Exportine 1

V

VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

V

VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

Z

ZAP-70	Zeta-associated protein-70
ZMYM3	Zinc finger, MYM-type 3

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

TABLEAU

Tableau 1 : Score de Matutes.....	34
Tableau 2 : Classification de Rai.....	36
Tableau 3 : Classification de Binet.....	36
Tableau 4 : Principaux facteurs pronostiques de la LLC.....	38
Tableau 5 : Sous-classification des stades A.....	38
Tableau 6 : Place de l'étude des marqueurs du pronostic lors de la prise en charge thérapeutique.....	46
Tableau 7 : Fonctions des protéines du complexe Shelterin.....	102
Tableau 8 : Principales anomalies chromosomiques récurrentes au cours de la LLC.....	104
Tableau 9 : Caractéristiques des mutations <i>TP53</i> parmi la cohorte de 85 patients	204
Tableau 10 : FISH pantélomérique. Nombre de signal télomérique multiple et de perte de signal chez les patients <i>TP53-mut/del</i> et <i>TP53-wt</i>	208
Tableau 11 : Régions chromosomiques ciblées par les sondes de MLPA incluses dans les kits P037 et P038.....	397

FIGURES

Figure 1 : Association des marqueurs prédictifs d'évolutivité dans la LLC selon le statut IgV_H (non muté versus muté)	44
Figure 2 : A/ Origine cellulaire des lymphomes à cellules B ; B/ Un modèle pour l'origine cellulaire de la LLC.....	50

Figure 3 : Rôle promoteur de la stimulation antigénique et des signaux transmis par le microenvironnement	54
Figure 4 : Représentation schématique des 2 voies de l'apoptose.....	56
Figure 5 : Représentation schématique de la structure des molécules de la famille BCL2.....	58
Figure 6 : Structure du gène <i>MCL1</i> et mécanismes de régulation de son expression.....	72
Figure 7 : Représentation schématique des voies de transduction du signal induit par l'IL6.....	78
Figure 8 : Transduction du signal induit par VEGF.....	86
Figure 9 : Structure des télomères humains.....	96
Figure 10 : Le complexe Shelterin.....	96
Figure 11 : Structure et interactions des protéines du complexe shelterin.....	98
Figure 12 : Problème de réplication terminale.....	106
Figure 13 : Dynamique de la longueur des télomères dans les cellules humaines, dépendante de la télomérase.....	108
Figure 14 : Régulation transcriptionnelle du gène <i>hTERT</i> : fixation des différents facteurs de transcription sur le promoteur du gène <i>hTERT</i>	108
Figure 15 : Organisation du gène <i>hTERT</i>	110
Figure 16 : Hypothèse télomérique du cancer.....	110
Figure 17 : Impact des anomalies cytogénétiques sur la survie.....	122
Figure 18 : Modélisation des étapes de transformation au cours de la LLC.....	130
Figure 19 : Structure du gène <i>TP53</i> et de la protéine p53.....	132
Figure 20 : Représentation schématique de la voie p53.....	134

Figure 21 : Effets de p53 dépendants et indépendants de l'activité transcriptionnelle.....	136
Figure 22 : Illustration de l'activité transcriptionnelle de p53 dans les lymphocytes.....	136
Figure 23 : Représentation schématique du rôle non transcriptionnel de p53 dans l'apoptose et l'autophagie.....	138
Figure 24 : Profil mutationnel de <i>TP53</i> au cours de la LLC.....	140
Figure 25 : Mutations récurrentes de la LLC : rôle des gènes concernés dans les voies de signalisation ou processus cellulaires.....	148
Figure 26 : répartition et type des 22 mutations <i>TP53</i> exoniques.....	204
Figure 27 : Signes de fragilité télomérique en FISH pantélomérique.....	206
Figure 28 : Longueur des télomères, expression de <i>hTERT</i> et des gènes du complexe shelterin en fonction de la présence d'une anomalie de <i>TP53</i>	206
Figure 29 : Longueur des télomères, expression de <i>hTERT</i> et nombre moyen d'anomalies caryotypiques en fonction des anomalies génomiques récurrentes.....	208
Figure 30 : Principe de la MLPA.....	395

I- DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Tableau 1: Score de Matutes, d'après Matutes *et al.*, 1994

Si le score est supérieur ou égal à 4, le diagnostic de LLC est retenu. Si le score est inférieur à 3, le diagnostic de LLC doit être écarté. Si le score est égal à 3, le diagnostic de LLC peut être retenu si les cellules lymphoïdes sanguines expriment les molécules CD5, CD23 et CD43, si l'expression du CD20 est faible et si la recherche de l'expression de cycline D1 est négative.

Cotation par item	1	0
CD5	+	-
CD23	+	-
Expression IgS monotypiques	Faible	Forte
FMC7	-	+
CD79b/CD22	Faible	Forte

1. LA LEUCEMIE LYMPHOIDE CHRONIQUE

1.1. Définition

D'après les critères IWCLL 2008 (International Workshop on CLL) et la classification OMS des hémopathies, la leucémie lymphoïde chronique (LLC) est un lymphome lymphocytaire B avec phase leucémique, c'est-à-dire caractérisé par l'accumulation dans le sang de petits lymphocytes B d'aspect mature, d'origine monoclonale et présentant un phénotype particulier [Hallek *et al.*, 2008] ; en effet, les lymphocytes monotypiques de LLC expriment des marqueurs B (CD19 et CD20), présentent de faibles taux d'immunoglobulines de membrane et de CD79b, co-expriment CD5 et CD23, et n'expriment pas FMC7 [Matutes *et al.*, 1994]. Le score de Matutes (**Tableau 1**), établi selon la présence ou l'absence de ces marqueurs, permet d'affirmer le diagnostic de LLC (s'il est supérieur ou égal à 4) ou de l'éliminer (s'il est inférieur à 3). La lymphocytose monoclonale doit être supérieure à 5 G/L pour porter le diagnostic de LLC ; entre 4 et 5 G/L, il s'agit d'une lymphocytose B monoclonale (MBL).

1.2. Incidence – Prévalence

La LLC est la plus fréquente des leucémies des pays occidentaux, avec une incidence annuelle moyenne de 3/100 000 habitants et une prévalence de 30 à 50/100 000 individus (0,03-0,05%). L'âge médian au diagnostic est de 64 ans ; la répartition homme - femme est respectivement de 65% et 35%.

1.3. Facteurs de risque

Les facteurs environnementaux ne semblent pas prépondérants dans la pathogénie de la maladie. La LLC est la seule leucémie pour laquelle il n'a pas été mis en évidence de corrélation avec l'irradiation ou l'exposition à des composants chimiques.

A l'inverse les facteurs génétiques semblent jouer un rôle dans la pathogénie de la maladie. En effet, l'incidence varie selon les pays : à titre d'exemple, elle représente 3,5% de toutes les leucémies de l'adulte au Japon, alors qu'elle atteint jusqu'à 38% au Danemark. Ce faible taux d'incidence dans les populations orientales est maintenu dans les populations migrantes et chez leur descendance, ce qui permet d'exclure l'existence de phénomènes

Tableau 2 : Classification de Rai, d'après Rai *et al.*, 1975

Pronostic	Stade	Critères de définition	Pourcentage des malades	Survie médiane (années)
Bon pronostic	Stade 0	Lymphocytose > 4 G/L	31 %	> 10
Pronostic intermédiaire	Stade I	Lymphocytose + adénopathies	35 %	9
Pronostic intermédiaire	Stade II	Lymphocytose + hépato- ou splénomégalie. Les adénopathies peuvent ne pas être présentes	26 %	5
Mauvais pronostic	Stade III	Lymphocytose + Hb < 110 g/L. Les organomégalies peuvent être ou ne pas être présentes	6 %	2
Mauvais pronostic	Stade IV	Lymphocytose + plaquettes < 100 G/L. Les organomégalies et l'anémie peuvent être ou ne pas être présentes	2 %	2

Tableau 3 : Classification de Binet, d'après Binet *et al.*, 1981

	Critères de définition	Pourcentage des LLC	Survie médiane (années)
Stade A Bon pronostic	Lymphocytose > 4 G/L Hb > 100 g/L Plaquettes > 100 G/L Moins de 3 aires lymphoïdes atteintes ⁽¹⁾	63 %	> 10
Stade B Pronostic intermédiaire	Lymphocytose > 4 G/L Hb > 100 g/L Plaquettes > 100 G/L Atteintes d'au moins trois aires lymphoïdes	30 %	5
Stade C Mauvais pronostic	Lymphocytose > 4 G/L Hémoglobine < 100 g/L et/ou plaquettes < 100 G/L, quel que soit le nombre d'aires lymphoïdes atteintes.	7 %	2

⁽¹⁾Les aires lymphoïdes considérées sont cervicales, axillaires, inguinales (uni- ou bilatérales), la rate et le foie

environnementaux ayant un effet sur les prédispositions génétiques [Boggs *et al.*, 1987].

De plus, des études épidémiologiques montrent l'existence, dans 5 à 10 % des cas, de prédispositions familiales [Yuille *et al.*, 2000], avec au moins deux individus affectés dans une même famille. Le risque de développer la LLC est 2 à 7 fois plus important dans ce cas, comparé à la population générale [Capalbo *et al.*, 2000]. Cette prédisposition familiale est accompagnée par ce que l'on appelle un phénomène d'anticipation [Wiernik *et al.*, 2001], c'est-à-dire une apparition précoce de la maladie et une évolution plus sévère pour les descendants des patients atteints de LLC.

Les polymorphismes génomiques pourraient également intervenir comme facteurs de susceptibilité à la LLC ; on peut citer par exemple un polymorphisme du promoteur du gène MDM2 parmi la population chinoise [Dong *et al.*, 2012].

1.4. Facteurs de pronostic : ARTICLE 1 en Annexe

1.4.1. Classifications clinico-biologiques

Le pronostic de la LLC a pendant longtemps été considéré comme imprévisible, car la survie de certains patients ne semblait pas raccourcie par l'affection, alors que pour d'autres, le décès survenait en quelques mois. Rai, en 1975, a publié une classification pronostique en cinq stades, très utilisée aux Etats-Unis (**Tableau 2**). Binet a ensuite proposé en 1981 une classification en 3 stades, largement utilisée en Europe car mieux adaptée à la réalisation d'essais thérapeutiques (**Tableau 3**).

Les classifications clinico-biologiques discriminent très bien les formes graves de la maladie. Les patients asymptomatiques (stades A voire stades B indolents) bénéficient d'une surveillance attentive et d'une abstention thérapeutique en l'absence de signe d'évolutivité ; à l'inverse, les patients en stades B/C ou présentant une maladie active bénéficient généralement de la mise en route d'un traitement [Hallek *et al.*, 2008].

Néanmoins, parmi les stades A qui représentent à l'heure actuelle 65% à 70% des cas, au moins 50% des patients vont rester stables pendant plusieurs années en abstention thérapeutique, alors que d'autres vont évoluer en stades B ou C. Pour tenter de prédire cette évolution, divers facteurs pronostiques complémentaires ont été décrits : certains sont reconnus, d'autre en cours d'évaluation. Parmi les facteurs de pronostic reconnus, les marqueurs biologiques classiques sont généralement distingués des marqueurs plus récemment rapportés.

Tableau 4 : Principaux facteurs de pronostic de la LLC

Paramètres	Pronostic Favorable	Pronostic Défavorable
<i>Classiques</i>		
Stade selon Binet	A	B, C
Sous-classification du stade A	A'	A''
Infiltration de la moelle osseuse	Non diffuse	diffuse
Pro-lymphocytes dans le sang (%)	≤ 10%	> 10%
Temps de doublement de la lymphocytose	> 12 mois	≤ 12 mois
Marqueurs sériques (β2-microglobuline, LDH, TDK, CD23)	Normaux	Elevés
<i>Nouveaux</i>		
Cytogénétique	Normale del(13q) isolée	del(11q) del(17p) translocations anomalies complexes
CD38	≤ 20%	> 20%
IgVH	Mutés (homologie ≤ 98%)	Non mutés (homologie > 98%)
ZAP-70	Négative	Positive

Tableau 5 : Sous-classification des stades A, Groupe Coopérateur Français sur la LLC, 1987

Critère de définition	Pourcentage des LLC	Survie médiane (années)
Stade A avec lymphocytose ≤ 30 G/L et Hb ≥ 120 g/L	49 %	> 10 ⁽¹⁾
Stade A avec lymphocytose > 30 G/L et/ou Hb < 120 g/L	14 %	7

⁽¹⁾Survie à 10 ans : 56 %

1.4.2. Marqueurs biologiques classiques

Cette catégorie, constituée de marqueurs pronostiques décrits dans les années 80-90 (**Tableau 4**), comprend les sous-groupes A' et A'' [Groupe Coopérateur Français sur la LLC, 1987, **Tableau 5**], le temps de doublement de la lymphocytose, [Montserrat *et al.*, 1986], l'aspect cytologique des lymphocytes, et surtout le pourcentage de prolymphocytes, [Melo *et al.*, 1987], l'aspect de l'envahissement de la biopsie médullaire, [Raphael *et al.*, 1988], les taux sériques de LDH, β 2Microglobuline (β 2M), CD23 sériques et thymidine kinase (TK) [Di Giovanni, *et al.*, 1989 ; Molica *et al.*, 1999 ; Sarfati *et al.*, 1996 ; Hallek *et al.*, 1999].

Les taux de β 2M et de LDH reflètent la masse tumorale, alors que le temps de doublement de la lymphocytose et le taux de thymidine kinase traduisent le potentiel prolifératif de la maladie. A ce titre, le temps de doublement de la lymphocytose reste un marqueur de prolifération très utilisé en clinique ; en effet, un temps de doublement inférieur à 6 mois traduit l'évolutivité de la pathologie et constitue un critère de traitement selon les critères de l'IWCLL [Hallek *et al.*, 2008]. Pepper *et al.* a récemment étudié l'impact des différents marqueurs du pronostic dans une large cohorte de patients en stade A (n=1154) : le temps de doublement demeure l'indicateur le plus puissant de la survie sans traitement en analyses uni- et multivariée (vs IGVH, CD38, ZAP70 et âge au diagnostic) [Pepper *et al.*, 2012].

Néanmoins, ces marqueurs biologiques restent le reflet d'une situation évoluée ou évolutive et constituent des informations rétrospectives qui ne sont pas prédictives de l'évolutivité de la maladie.

1.4.3. Marqueurs biologiques récents

A partir des années 2000, de nouveaux facteurs de pronostic ont été rapportés (**Tableau 4**) en se basant sur la physiopathologie de la maladie.

Ainsi la présence ou l'absence de mutations somatiques dans les régions variables des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgV_H) [Hamblin *et al.*, 1999 ; Damle *et al.*, 1999] ont été décrites comme marqueur prédictif majeur de l'évolution de la LLC. Ces mutations constituent un phénomène physiologique au cours de la différenciation des lymphocytes B ; elles surviennent dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires dans le but d'obtenir une meilleure affinité de l'anticorps pour l'antigène. Ainsi,

la présence ou l'absence de mutations somatiques des gènes des immunoglobulines suggère que la transformation maligne pourrait survenir à différents stades de développement du lymphocyte B : les LLC exprimant des immunoglobulines non mutées correspondraient à la transformation maligne d'une cellule B naïve, n'ayant pas transité par le centre germinatif, alors que les LLC exprimant des immunoglobulines mutées correspondraient à la transformation maligne d'une cellule B mémoire ayant traversé le centre germinatif. [Damle *et al.*, 1999 ; Hamblin *et al.*, 1999]. Ce marqueur présente l'intérêt d'être stable au cours de l'évolution. Il est à noter que certains gènes IgV_H semblent échapper à la classification mutée/non mutée et confèrent leur propre valeur pronostique. C'est le cas notamment du gène IgV_H 3-21 dont la présence est défavorable, indépendamment du pourcentage d'homologie [Tobin *et al.*, 2002]. Cependant, les difficultés techniques ne rendent pas accessible cette analyse en routine et des marqueurs de substitution ont été proposés, notamment l'expression membranaire de CD38 et l'expression cytoplasmique de ZAP-70.

L'expression de CD38, qui permet de distinguer les cellules naïves des cellules mémoires, a initialement été rapportée comme inversement corrélée au stade mutationnel des IgV_H, [Damle *et al.*, 1999 ; Hamblin *et al.*, 1999]. Cependant, il a par la suite été démontré que l'expression de CD38 ne constitue pas un marqueur de substitution mais un marqueur pronostique indépendant du statut mutationnel des IgV_H [Ibrahim *et al.*, 2001 ; Hamblin *et al.*, 2002].

Les puces d'expression ont mis en lumière l'expression différentielle de ZAP-70 –une tyrosine kinase normalement exprimée dans les cellules T- au cours des LLC mutées et non mutées [Rosenwald *et al.*, 2001]. En effet, l'expression de ZAP-70 est induite par le BCR, dont la signalisation est active au cours des LLC naïves, ce qui semble contribuer à l'évolution plus agressive de ces patients [Chen *et al.*, 2002]. Il a été confirmé secondairement que cette expression est fortement corrélée à l'absence de mutation des IgV_H, alors que les LLC mutées n'expriment pas ZAP-70, ce qui permet de discriminer patients mutés et non mutés [Crespo *et al.*, 2003 ; Wiestner *et al.*, 2003 ; Orchard *et al.*, 2004] ; l'utilisation de ce marqueur comme substitut au statut IgV_H est cependant limitée par les difficultés de standardisation de la technique de cytométrie en flux, en particulier le problème du cut-off qui varie selon les publications. L'expression de ZAP-70 est par ailleurs corrélée à la progression de la maladie, à la survie et à la nécessité d'un traitement ; elle constitue à ce titre un marqueur pronostique indépendant puissant [Crespo *et al.*, 2003 ; Wiestner *et al.*, 2003 ; Rassenti *et al.*, 2004].

Enfin, les aberrations génomiques, correspondant aux anomalies cytogénétiques récurrentes et à la présence de mutations somatiques, ont également fait la preuve de leur impact prédictif puissant et indépendant. L'inactivation de *TP53* -par délétion 17p ou par survenue d'une mutation- est le marqueur pronostique le plus puissant à l'heure actuelle ; cette anomalie s'accompagne d'une résistance aux chimiothérapies à base de fludarabine et d'alkylants et tient de fait une place particulière dans la prise en charge des patients. L'ensemble des anomalies génomiques et leur valeur pronostique sera détaillé ci-dessous (*Données bibliographiques - Chapitre 5*).

1.4.4. Evaluation de la Maladie Résiduelle (MRD)

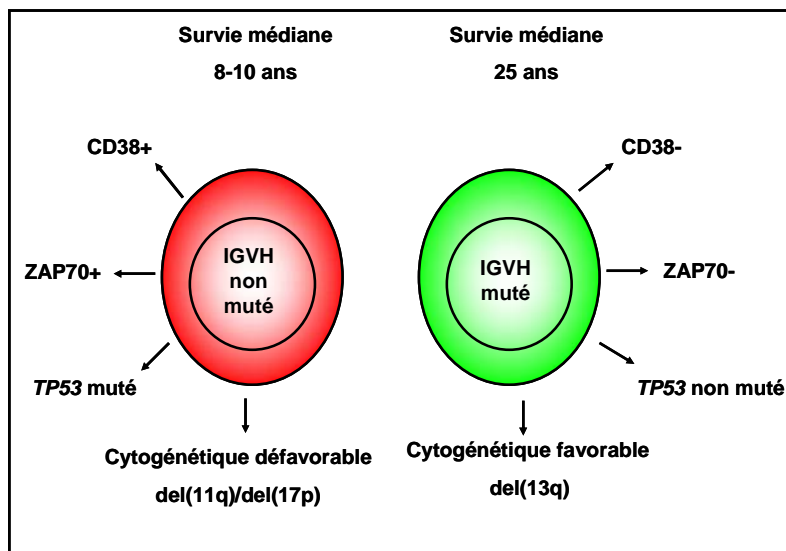
L'éradication complète de la LLC est l'objectif du traitement. Néanmoins, la cytométrie en flux multicouleur et la qRT-PCR ont démontré que la plupart des patients qui atteignent une réponse complète selon les critères IWCLL présente toujours une maladie résiduelle détectable. En pratique, la MRD, généralement déterminée par cytométrie en flux, est un marqueur prédictif de la survie globale (OS) et de la survie sans progression (PFS) dans la LLC. En effet, un faible niveau de maladie résiduelle pendant et après traitement a été associé avec une PFS et une OS prolongées (PFS médiane de 68 mois si $MRD < 10^{-4}$ versus 15 mois si $MRD \geq 10^{-2}$) [Böttcher *et al.*, 2012]. Ce marqueur constitue donc un outil d'évaluation de l'efficacité thérapeutique au cours des protocoles de recherche clinique.

1.4.5. Facteurs pronostiques en cours d'évaluation

Divers autres facteurs du pronostic corrélés au statut mutationnel ont été proposés, mais leur impact clinique nécessite d'être validé par des travaux complémentaires, notamment dans le cadre d'études prospectives.

Ainsi, l'expression de la sous-unité catalytique de la télomérase (*hTERT*), déterminée par RT-PCR quantitative, permet de discriminer les LLC mutées des LLC non mutées dans 89% des cas, aussi bien parmi les patients tous stades confondus que parmi les stades A (résultats obtenus sur une série de 115 patients) [Tchirkov *et al.*, 2004]. La longueur des télomères, évaluée par PCR quantitative en temps réel, est également un facteur de pronostic qui, utilisé en combinaison avec le statut mutationnel des IgVH, permet d'identifier deux groupes de patients parmi les patients mutés, l'un avec des télomères plus longs et une survie plus favorable et l'autre avec des télomères raccourcis et une évolution défavorable [Grabowski *et al.*, 2005].

Figure 1 : Association des marqueurs prédictifs d'évolutivité dans la LLC selon le statut IgV_H (non muté versus muté)



Une expression élevée de l'ARN messager du gène *AID* (*Activation-Induced cytidine Deaminase*) est associée à l'absence de mutation des gènes des IgVH et à la présence d'anomalies cytogénétiques péjoratives [Heintel *et al.*, 2004]. Des observations similaires ont été rapportées pour les gènes *LPL* (*Lipoprotéine Lipase A*) et *ADAM29* (*A Disintegrin And Metalloproteinase 29*), qui ne sont pas exprimés par les lymphocytes normaux et peuvent à ce titre être évalués par RT-PCR quantitative [Oppezzo *et al.*, 2005].

L'augmentation de l'expression du gène *CLLU1* est corrélée au statut IgVH non muté, à l'expression de ZAP-70 et de CD38, et à l'absence de délétion 13q ; elle est associée à une PFS et une OS raccourcie [Gonzales *et al.*, 2010].

Une relation directe entre le niveau plasmatique de la thrombopoïétine (TPO) et des gènes IgV_H non mutés a également été rapportée [Koller *et al.*, 2006].

Un niveau sérique élevé de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), déterminé par ELISA, serait prédictif du risque de progression des formes précoces de LLC [Molica *et al.* 1999]; par ailleurs il existe une corrélation positive entre le niveau de VEGF circulant et l'expression de ZAP-70, l'expression de CD38 et le statut mutationnel des IgVH [Molica *et al.*, 2007].

TCL-1 est un proto-oncogène et un modulateur d'AKT exprimé différemment au cours de la LLC. Des niveaux élevés de *TCL-1* ont été fortement associés à des caractéristiques d'agressivité de la maladie, comme un stade clinique avancé et un temps de doublement de la lymphocytose court [Herling *et al.*, 2009]. Une expression forte de *TCL-1* est également un prédicteur indépendant d'une survie sans progression raccourcie, quel que soit le traitement administré, particulièrement pour les tumeurs ZAP-70+.

1.4.6. Place dans la prise en charge thérapeutique

En définitive, les marqueurs du pronostic de la LLC sont très nombreux, et la revue de la littérature ci-dessus n'est pas exhaustive, mais aucun n'est univoque et ne permet à lui seul d'appréhender l'évolutivité de la pathologie. La **Figure 1** résume l'association des marqueurs prédictifs majeurs entre eux en fonction du statut IgV_H.

Tableau 6 : Place de l'étude des marqueurs du pronostic lors de la prise en charge thérapeutique, recommandations de l'IWCLL d'après Hallek *et al.*, 2008

Diagnostic test	General Practice	Clinical trial
Test to establish the diagnostic		
Complete blood count and differential count	Always	Always
Immunophenotyping of lymphocytes	Always	Always
Assessment before treatment		
History and physical, performance status	Always	Always
Complete blood count and differential	Always	Always
Marrow aspirate and biopsy	Desirable	Desirable
Serum chemistry, serum immunoglobulin, direct antiglobulin test	Always	Always
Chest radiograph	Always	Always
Infectious disease status	Always	Always
Additional tests before treatment		
Cytogenetics (FISH) for del(13q), del(11q), del(17p), trisomy 12, del(6q) in the peripheral blood lymphocytes	Desirable	Always
IgVH mutational status, ZAP-70 and CD38	NGI	Always
CT scan of chest, abdomen and pelvis	NGI	Desirable
MRI, lymphangiogram, gallium scan, PET scans	NGI	NGI
Abdominal ultrasound	Possible	NGI

L'évaluation de l'ensemble des marqueurs du pronostic décrits précédemment n'est pas réalisée en routine, du fait du coût et de la difficulté technique de certaines analyses, notamment de l'étude du statut IgV_H. Le **Tableau 6** (d'après Hallek *et al.*, 2008) indique la place de chaque examen lors de la prise en charge thérapeutique, en routine ou au cours d'un essai clinique. Depuis ces recommandations IWCLL, datant de 2008, la recherche de délétion 17p est devenue indispensable avant toute décision thérapeutique, aussi bien en recherche qu'en routine. De la même façon, l'étude des mutations de *TP53* devient incontournable dans les protocoles de recherche.

1.5. Principes de traitement

Pour les formes précoces (stades A et « petits » stades B), l'abstention thérapeutique et la surveillance attentive est de mise.

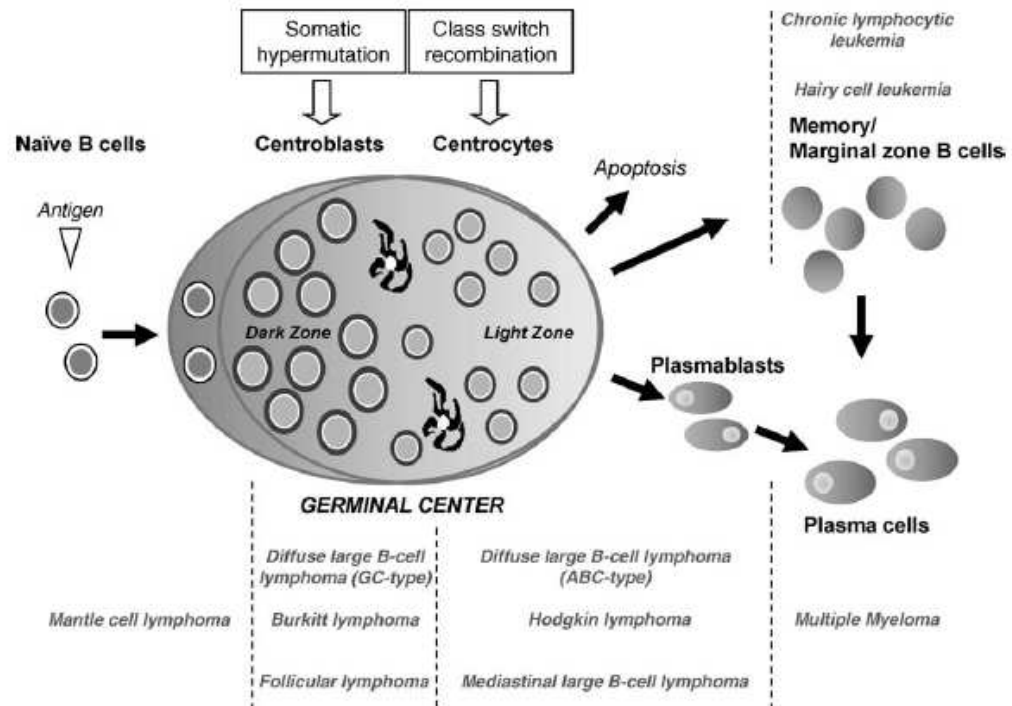
Chez certains patients, l'accumulation progressive des cellules tumorales entraîne une hyperleucocytose parfois très importante, l'apparition d'adénopathies, de splénomégalie, d'une insuffisance médullaire et de cytopénies. Les infections récurrentes sont fréquentes. Des cytopénies auto-immunes peuvent également survenir. En cas de progression de la maladie, se traduisant par la présence d'un syndrome tumoral significatif et/ou de cytopénies, un traitement sera entrepris, en fonction de l'état général du patient. Les caractéristiques cliniques et biologiques conduisant à la mise en route d'un traitement ont été clairement définies en 2008 par l'IWCLL [Hallek *et al.*, 2008].

Les options thérapeutiques sont en nombre croissant. Néanmoins, la chimiothérapie ne permet pas d'obtenir une guérison définitive à l'heure actuelle. La fludarabine, une drogue de la classe des analogues des purines, assure l'obtention de taux de réponse plus élevés et de survie sans progression (PFS) plus prolongée que les alkylants [Rai *et al.*, 2000]. La combinaison de fludarabine et de cyclophosphamide (FC) en première ligne permet d'augmenter le taux de réponse ainsi que la PFS [O'Brien *et al.*, 2001 ; Hallek *et al.*, 2001; Eichhorst *et al.*, 2006]. La triple association rituximab-fludarabine-cyclophosphamide (RFC) est supérieure à FC et augmente considérablement le taux de réponse complète (44% avec RFC vs 22% avec FC), le nombre de patients ayant une maladie résiduelle minime et la PFS à 3 ans (65% avec RFC vs 45%) [Hallek *et al.*, 2010]. Ce traitement par RFC est actuellement le traitement de référence en première ligne pour des patients à l'état général conservé, sans altération de la fonction p53.

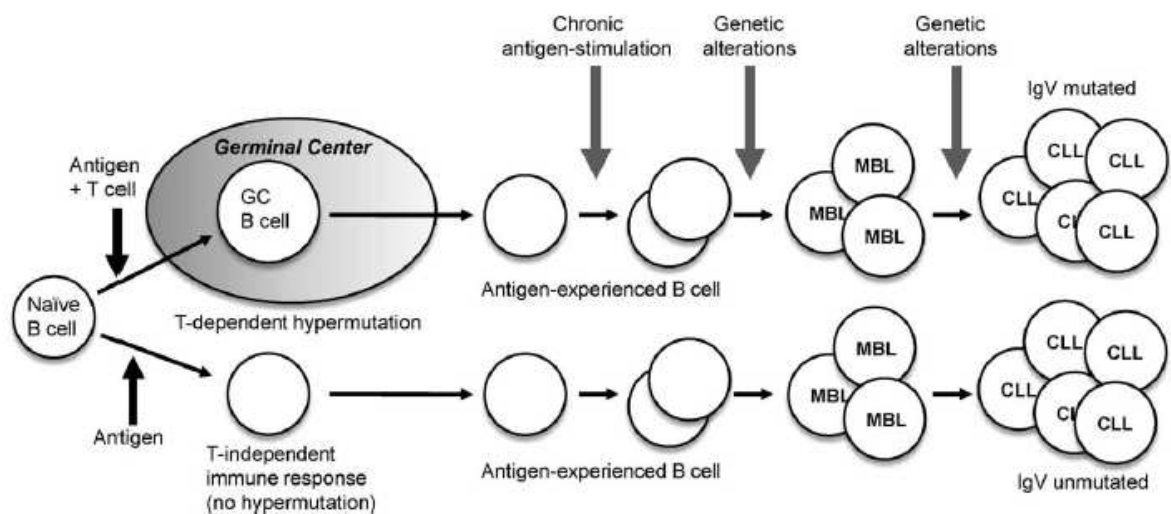
A la rechute, après la première ligne ou les suivantes, l'évolution dépendra de différents facteurs. L'un des éléments déterminants est l'état général du patient, compte tenu de la morbidité et de la mortalité des phénomènes infectieux. Les patients altérés seront traités de façon plus prudente, avec adaptation de doses. Pour les patients en bon état général, l'utilisation de traitement plus efficaces, mais également plus toxiques, pourra être proposée, afin d'obtenir la meilleure réponse possible. Le nombre et le type des lignes de traitement précédents, tout comme la qualité et la durée des réponses obtenues, ont également une valeur pronostique majeure. Les patients rechutant dans les 2 ans (voire dans les 3 ans) après une première ligne contenant de la fludarabine présentent des réponses de mauvaise qualité en deuxième ligne ainsi qu'une survie raccourcie [Keating *et al.*, 2009]. L'absence de réponse ou la rechute dans les 6 mois suivant un traitement contenant de la fludarabine définit le statut réfractaire à la fludarabine, associé à un pronostic très péjoratif et une OS de l'ordre de 10 mois [Keating *et al.*, 2002 (a)]. La taille des adénopathies est également importante, car certains traitements sont moins efficaces en cas de forte masse tumorale, comme l'allogreffe ou les anticorps monoclonaux, en particulier l'alemtuzumab [Keating *et al.*, 2002 (b) ; Sorrow *et al.*, 2008]. Enfin, la présence d'une anomalie de *TP53* (délétion et/ou mutation) est une information cruciale avant le choix thérapeutique.

Figure 2 : A/ Origine cellulaire des lymphomes à cellules B ; B/ Un modèle pour l'origine cellulaire de la LLC (d'après Klein *et al.*, 2010)

A



B



2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA LLC

2.1. Origine cellulaire de la LLC

En se fondant sur les caractéristiques cytologiques et phénotypiques des lymphocytes de LLC, cette hémopathie a longtemps été considérée comme dérivant d'un **lymphocyte B naïf au repos**. L'immunophénotype des lymphocytes de LLC est néanmoins différent de celui de toute cellule B normale.

Une avancée majeure dans la compréhension de la LLC est survenue en 1999, quand différentes équipes ont indépendamment démontré que le taux de mutations somatiques dans les **gènes des domaines variables des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgV_H)** permettait de subdiviser la maladie en deux groupes distincts ayant des évolutions cliniques différentes [Hamblin *et al.*, 1999 ; Damle *et al.*, 1999]. La LLC n'apparaît alors plus comme une entité unique mais comme l'association dans une même entité nosologique de deux sous-types de maladies dérivant d'une cellule à des stades de maturation différents. Les LLC mutées (~50%) pour les IgV_H dériveraient d'une cellule dont l'origine est centro-germinative ou post-centre germinatif tandis que les LLC non mutées (~50%) proviendraient d'une cellule naïve d'origine pré-centre germinatif ou indépendante du centre germinatif. Cette dichotomie constitue une particularité au sein des hémopathies lymphoïdes B, car la plupart des lymphomes présentent des IgV_H mutés, indiquant que la cellule transformée appartient au centre germinatif ou a transité par cet environnement (à l'exception des lymphomes du manteau qui comportent seulement 20% de patients mutés) (**Figure 2A**) [Küppers *et al.*, 1999].

Les études de profil d'expression globale démontrent que les LLC présentent pourtant un profil homogène, quel que soit leur statut mutationnel, suggérant malgré tout l'existence d'un **précurseur cellulaire commun** [Klein *et al.*, 2001 ; Rosenwald *et al.*, 2001]. Ces analyses révèlent également que ce profil d'expression est proche de celui de **cellules B ayant expérimenté l'antigène**, ce qui inclut les cellules B mémoires classiques et les cellules B de la zone marginale, qui peuvent être somatiquement mutées ou non.

Au total, un des modèles proposé pour l'origine cellulaire de la LLC est schématisé **Figure 2B**. Les cellules B naïves peuvent être entraînées dans une réponse immunitaire T-dépendante (avec hypermutation des IgV_H dans le centre germinatif) ou T-indépendante (sans

hypermutation des IgV_H). Selon l'achèvement des réponses, la cellule se différencie en cellule B de la zone marginale ou en cellule B mémoire. Sous l'effet d'une stimulation antigénique chronique, la cellule reste activée et acquiert avec le temps des altérations génétiques menant à la survenue d'un clone phénotypiquement anormal (MBL), puis à la transformation oncogénique.

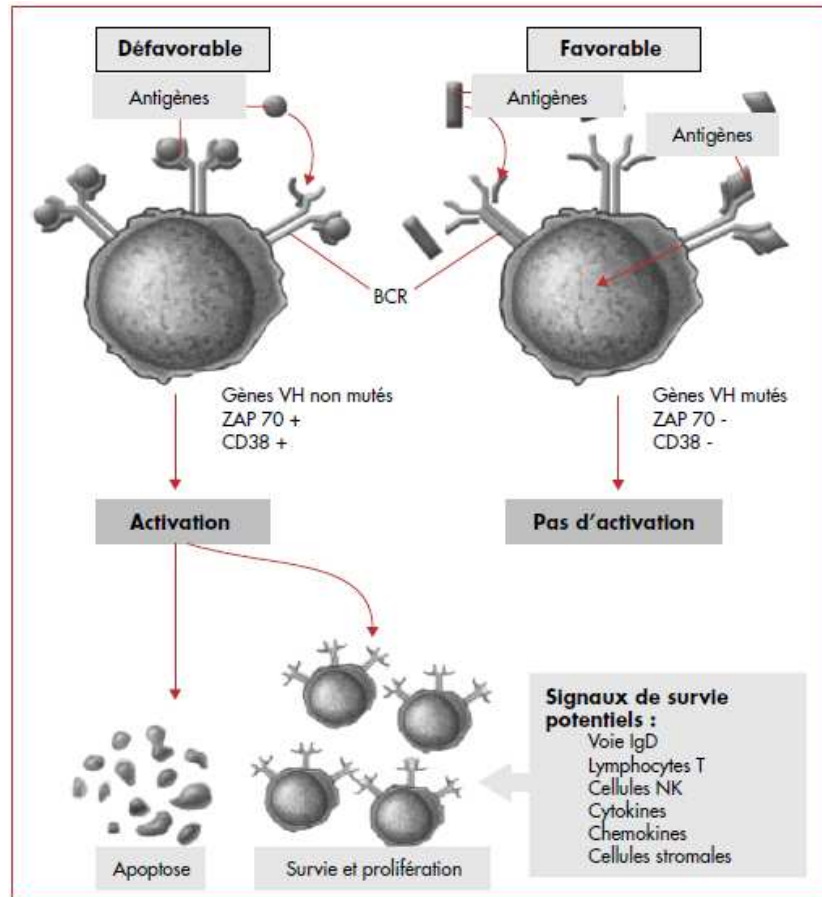
2-2. Rôle de la stimulation antigénique du BCR

Plusieurs constatations, issues de l'analyse de la structure des IgV_H, plaident clairement en faveur d'une cellule originelle ayant expérimenté l'antigène et étayent le rôle fort de l'antigène dans la physiopathologie de la LLC.

Tout d'abord, l'expression du répertoire des gènes des immunoglobulines des cellules de LLC est biaisée et se distingue du répertoire des cellules B normales par une **utilisation préférentielle de certains gènes IgV_H** : certains gènes (par exemple IgV_H 1-69) sont préférentiellement utilisés dans les réarrangements non mutés, alors que d'autres gènes (par exemple IgV_H 4-34) sont plus fréquents dans les réarrangements mutés [Stevenson & Caligaris-Cappio, 2004]. Par ailleurs, certains patients présentent une **très forte similarité de leurs BCR, dit « stéréotypés »**, qui utilisent les mêmes gènes dans leur réarrangement et possèdent, de plus, un CDR3 quasiment identique [Tobin *et al.*, 2003]. En considérant les événements combinatoires qui se déroulent lors de la synthèse des immunoglobulines (réarrangement V D J), ajoutés aux mécanismes de diversité des immunoglobulines (hypermutation somatique, N-diversité et commutation de classe), la probabilité d'avoir deux clones de cellules B indépendants qui exprimeraient à leur surface des récepteurs d'antigènes identiques est pratiquement nulle. La restriction très importante des possibilités de diversité du BCR (jusqu'à 1% de BCR identiques) est donc en faveur de l'hypothèse de l'**intervention d'un nombre limité d'anticorps dans la leucémogénèse** et suggère que la liaison entre un antigène et un récepteur peut faire une différence en termes de pathogenèse de la maladie, de présentation clinique et, par conséquent, de pronostic [Laoutaris *et al.*, 2008].

La nature de ces antigènes reste à ce jour encore inconnue, mais on peut émettre l'hypothèse que des virus latents ou des bactéries commensales activent répétitivement des clones de cellules B. La LLC serait dans ce cas la conséquence directe ou indirecte d'infections spécifiques et serait entretenue par celles-ci d'une manière semblable à ce qui a été décrit pour les lymphomes gastriques qui évoluent en réponse à *Helicobacter pylori* [Cavalli *et al.*, 2001]. D'autre part, des antigènes environnementaux ou des auto-antigènes

Figure 3 : Rôle promoteur de la stimulation antigénique et des signaux transmis par le microenvironnement, d'après Chiorazzi *et al.*, 2005



pourraient entraîner une expansion clonale, car les cellules de LLC ont fréquemment des récepteurs polyréactifs qui lient de multiples antigènes, incluant les autoantigènes, ce qui permet leur stimulation simultanée par des auto-antigènes et des antigènes microbiens [Chiorazzi *et al.*, 2005]. De plus, étant donné qu'un « signaling » constitutif faible existe dans les cellules B normales via le BCR, l'antigène pourrait ne pas être nécessaire à la persistance ultérieure de l'expansion clonale ; une stimulation indépendante peut survenir à travers le BCR. Néanmoins, le BCR doit propager un signal efficace vers le noyau pour que la stimulation antigénique permette l'expansion clonale : cette capacité varie d'un sous-groupe de LLC à l'autre et survient majoritairement dans les LLC non mutées.

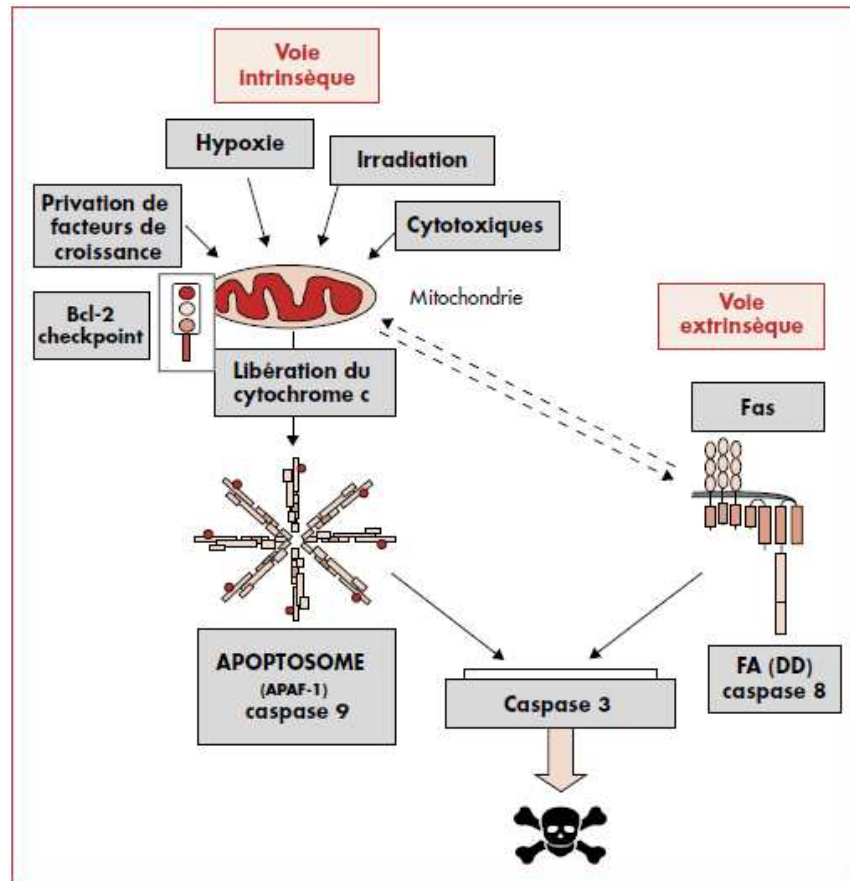
Une fois la transduction du signal initiée par le BCR, la cellule va soit progresser dans le cycle cellulaire soit mourir. La stimulation par une IgM à la surface des cellules de LLC peut entraîner ou inhiber l'apoptose (**Figure 3**), tandis que la stimulation par une IgD de surface inhibe invariablement l'apoptose [Bernal *et al.*, 2001 ; Zupo *et al.*, 2002], si bien que l'évolution de chaque cellule de LLC dépend de la balance entre ces signaux. Il a été également démontré qu'un **signal soutenu via le BCR induit l'expression de *MCL1*** et favorise la survie cellulaire [Petlickovski *et al.*, 2005].

Au total, la stimulation antigénique du BCR, en parallèle avec les interactions des cellules accessoires et des cytokines, est un **facteur de promotion entraînant la prolifération des cellules de LLC et permettant d'éviter la mort cellulaire**.

La signalisation du BCR s'accompagne d'une **signature génomique forte** au cours de la LLC, bien différente des autres hémopathies lymphoïdes [Klein *et al.*, 2001] ; cette signature comporte notamment l'inactivation de voies de l'apoptose.

Quelques centaines de gènes sont cependant exprimés différemment entre les 2 formes mutées et non mutées [Rosenwald *et al.*, 2001]. Parmi ceux-ci, les gènes d'activation B sont les plus discriminants. **L'expression du gène *ZAP-70*** est en particulier très fortement corrélée à l'absence de mutations des gènes IgV_H [Wiestner *et al.*, 2003]. Cette tyrosine kinase, membre de la famille SYK, était connue comme essentielle à la signalisation des cellules T et NK, mais rare dans les cellules B normales ; il s'est avéré ensuite que ZAP-70 est exprimée dans une partie des LLC, où cette kinase potentialise la signalisation du BCR et semble impliquée dans le maintien du BCR à la membrane.

Figure 4 : Représentation schématique des 2 voies de l'apoptose, d'après Chiorazzi *et al.*, 2005



Enfin, il faut noter qu'une activation cellulaire répétée peut entraîner une érosion significative des télomères [Martens *et al.*, 2002]. Dans les cellules B normales, l'activation de la télomérase, médiée par le BCR, permet de contrer ce phénomène et d'assurer la longévité des cellules [Igarashi *et al.*, 1997]. Dans les cellules de LLC non mutées pour les IgVH, l'activation du BCR indépendante des cellules T augmente effectivement l'activité de la télomérase et la survie cellulaire de façon évidente, même en l'absence de prolifération cellulaire majeure ; ce phénomène n'est par contre pas mis en évidence dans les cellules de LLC mutées [Damle *et al.*, 2012]. Ceci souligne que la **qualité de l'antigène** (valence, affinité) **peut déterminer la longévité cellulaire dans la LLC** ; ces résultats suggèrent également que d'autres interactions stimulant le BCR (dépendantes des cellules T par exemple) pourraient permettre la régulation positive de la télomérase dans les LLC mutées.

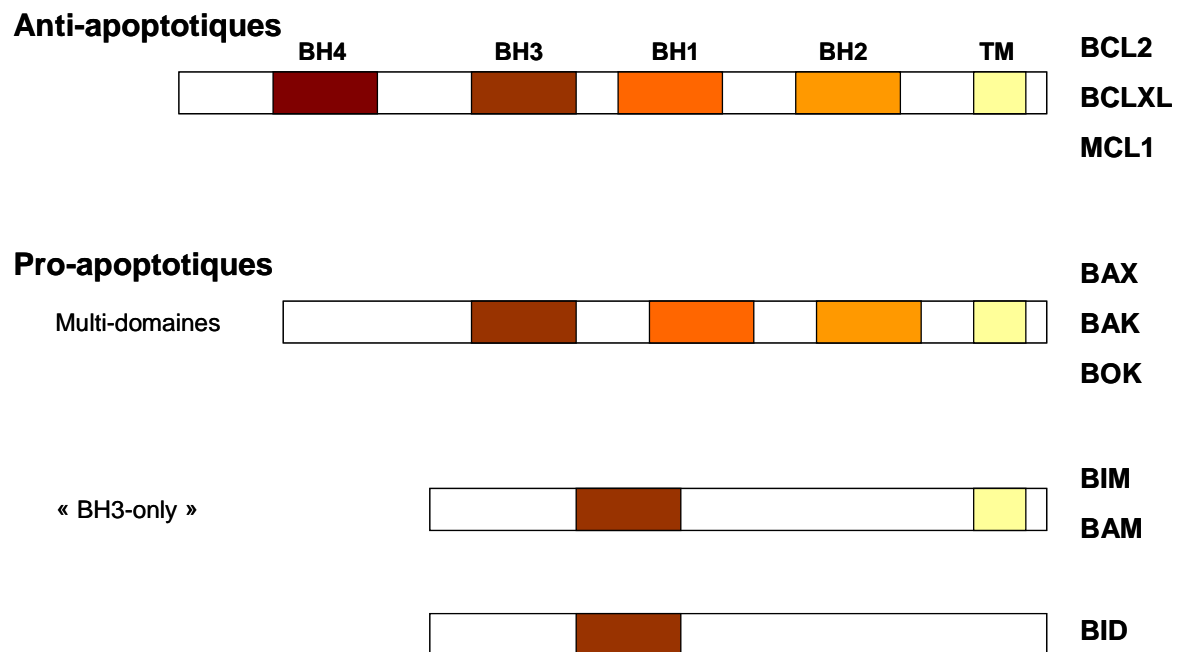
2.3. Résistance à l'apoptose

2.3.1. Voies de l'apoptose

Il est communément admis que la LLC se caractérise par une dysrégulation de l'apoptose conduisant à une accumulation de cellules.

De façon générale, il existe deux voies principales d'apoptose (**Figure 4**) convergeant sur les caspases qui représentent les effecteurs clés de l'exécution de la cascade apoptotique. La **voie intrinsèque** est activée par un large spectre de signaux tels les drogues cytotoxiques, l'irradiation, la privation de facteurs de croissance et les stress cellulaires. Elle implique la libération de protéines mitochondriales, en particulier le cytochrome c qui va s'unir à la protéine cytosolique APAF-1, l'ensemble provoquant une cascade d'activation de caspases, de la caspase 9 jusqu'à la caspase effectrice, la caspase 3, aboutissant ainsi aux changements morphologiques et biochimiques qui définissent l'apoptose. La **voie extrinsèque** est activée par des récepteurs de mort, membres de la famille TNF, présents à la surface cellulaire et possédant un domaine de mort commun intracytoplasmique (DD). Ces récepteurs, dont le plus connu est la molécule FAS (CD95), déclenchent directement la cascade des caspases à partir de la caspase 8 qui va se lier à la protéine FA (DD) et entraîner l'apoptose. Dans la LLC, c'est essentiellement l'activation de la caspase 9 qui est en cause, c'est-à-dire la voie intrinsèque de l'apoptose.

Figure 5 : Représentation schématique de la structure des molécules de la famille BCL2



2.3.2. Membres de la famille BCL2

Les molécules de la famille BCL2 peuvent agir comme des activateurs ou des inhibiteurs de l'apoptose. Elles sont caractérisées par la présence de 1 à 4 séquences courtes comportant moins de 20 acides aminés, appelés domaines BH (BCL2 homologie). Plus de 20 membres ont été identifiés et sont classés en 3 sous-familles (**Figure 5**) : le sous-groupe antiapoptotique, comportant BCL2, BCLXL et MCL1 qui contiennent 4 domaines BH (BH1-BH4) ; le groupe des protéines pro-apoptotiques telles que BAX, BAK et BOK contenant 3 domaines BH (BH1-BH3) ; le troisième groupe de protéines pro-apoptotiques telles que BIM, BAD et BID contenant seulement un domaine BH3. C'est l'expression relative de l'activité de ces protéines de la famille BCL2 qui va déterminer de façon critique la sensibilité à l'apoptose. La coordination de ces fonctions n'est pas clairement connue mais une cible clé apparaît être la libération par la mitochondrie du cytochrome c et par là, l'activation de la cascade des caspases [Packham *et al.*, 2005].

Dans la LLC, les mécanismes moléculaires de régulation de l'apoptose ne sont que partiellement compris, mais l'importance des protéines pro et anti-apoptotiques de la famille BCL2 est reconnue. En effet, plusieurs études ont mis en évidence un **niveau élevé de la protéine anti-apoptotique BCL2** par rapport à la protéine pro-apoptotique BAX, les ratios BCL2/BAX élevés étant souvent corrélés avec une maladie agressive ou une mauvaise réponse au traitement [Pepper *et al.*, 1996 ; Kitada *et al.*, 1998 ; Saxena *et al.*, 2004]. Une hypométhylation du promoteur du gène *BCL2* a longtemps été considérée comme étant à l'origine de la surexpression de BCL2 [Hanada *et al.*, 1993]. Cependant, il a été ensuite démontré que miR-15a et miR-16-1 sont délétés ou sous-exprimés dans la majorité des LLC, ces 2 micro-ARN étant connus pour réguler négativement l'expression de *BCL2* au niveau post-traductionnel [Cimmino *et al.*, 2005]. D'autre part, l'antigène CD38, associé aux LLC agressives, module la signalisation intracellulaire et entraîne une augmentation d'expression de *BCL2* et une inhibition de l'apoptose [Lin *et al.*, 2002].

Par la suite, le gène *MCL1* (*Myeloid Cell Leukemia-1*), un membre anti-apoptotique de la famille BCL2, a été reconnu comme impliqué dans la régulation de l'apoptose au cours de la LLC : les données de la littérature concernant *MCL1* sont développées ci-dessous (*Données Bibliographiques - Chapitre 3*).

Enfin, il est important de considérer que d'autres régulateurs classiques de l'apoptose, tels p53 et ATM, sont également fréquemment altérés dans les cellules leucémiques (*Données Bibliographiques - Chapitre 5*).

2.3.3. Apoptose chimio-induite

En dépit d'options thérapeutiques efficaces, la rechute après chimiothérapie conventionnelle est caractéristique de la LLC, ce qui en fait un **modèle de résistance à l'apoptose chimio-induite**. Ces mécanismes de chimiorésistance ne sont que partiellement compris. L'un des phénomènes documentés est l'inactivation de la voie p53 qui entraîne une résistance à la chimiothérapie conventionnelle, en particulier la fludarabine et les alkylants. Les altérations d'autres membres de la voie p53, incluant ATM et mir-34a, peuvent également induire une chimiorésistance [Zenz *et al.*, 2009]. Le rôle de la surexpression de protéines anti-apoptotiques de la famille BCL2, comme BAX et BFL-1, a également été suggéré [Bosanquet *et al.*, 2002 ; Olsson *et al.*, 2007]. Enfin, il a été démontré que la présence de cellules stromales confère une résistance au nouvel inhibiteur de BCLXL et BCL2A1 (nommé ABT-737), soulignant le rôle du microenvironnement [Vogler *et al.*, 2009].

2.4. Rôle du microenvironnement

Les signaux délivrés par des **facteurs solubles ou par des contacts directs de cellule à cellule**, qui peuvent survenir parallèlement ou non à la stimulation du BCR, favorisent probablement la croissance des cellules B [Chiorazzi *et al.*, 2005]. En effet, la résistance à l'apoptose *in vivo*, qui définit la maladie, et à l'inverse l'augmentation de l'apoptose spontanée lorsque les cellules sont cultivées *ex vivo*, impliquent que ces cellules ont perdu des facteurs nécessaires à leur survie. Ces interactions surviennent préférentiellement dans les pseudofollicules (centres de croissance ganglionnaires et médullaires), ce qui peut être mis en évidence par l'expression de Ki-67, marqueur des cellules en cycle, par les cellules leucémiques présentes dans ces sites.

Les cellules leucémiques possèdent à leur surface le récepteur de chemokine **CXCR4** (CD184), dont le ligand CXCL12, sécrété par les cellules stromales de la moelle et les cellules *nurse-like* dérivées des monocytes du sang, leur permet d'échapper à l'apoptose par contact direct de cellule à cellule [Burger *et al.*, 1999].

De la même manière, l'**interaction entre CD38 et son ligand naturel CD31**, exprimé par les mêmes cellules du microenvironnement, favorise la croissance de la population leucémique, d'autant plus que le contact de ces deux molécules entraîne l'expression du récepteur CD100, une sémaphorine impliquée dans le maintien de la croissance cellulaire des cellules proliférantes [Deaglio *et al.*, 2005 ; Deaglio *et al.*, 2006].

Les cellules de LLC expriment aussi à leur surface le marqueur **CD40** qui, sous l'action de son ligand spécifique CD40L/CD154, secrété par les cellules T CD4 activées, vont déclencher la synthèse de la survivine, molécule inhibitrice de l'apoptose. Ainsi, la stimulation de CD40, qui appartient à la famille des récepteurs du TNF, contribue à protéger les cellules de LLC de l'apoptose et à favoriser leur prolifération [Granziero *et al.*, 2001].

Un autre mécanisme de survie des cellules leucémiques qui a été proposé est l'**induction de MCL1** par les cellules folliculaires dendritiques *via* le marqueur CD44 [Pedersen *et al.*, 2001]. D'autres cytokines qui peuvent être augmentées dans la LLC contribuent à la survie et/ou la prolifération du clone leucémique, en particulier l'**IL4**, le **VEGF**, et un facteur de croissance spécifique des cellules B, **APRIL** [Ghia *et al.*, 2005 ; Kern *et al.*, 2004].

2.5. Prolifération

Outre un dysfonctionnement des mécanismes de l'apoptose observé chez tous les patients atteints de LLC, plusieurs constatations témoignent qu'il existe une **part proliférative dans la population B leucémique**. Celle-ci se traduit par la variabilité des présentations cliniques et l'hétérogénéité des marqueurs biologiques à valeur pronostique qui lui sont reliée : le temps de doublement de la lymphocytose, l'augmentation du taux sérique de la thymidine kinase et du CD23 soluble, la présence de marqueurs d'activation à la surface cellulaire, en particulier le CD38, et l'expression de la protéine ZAP-70.

Le compartiment prolifératif, localisé dans la moelle et dans les ganglions au sein des centres de prolifération ou pseudofollicules, a pu être mis en évidence et quantifié par des études *in vivo* utilisant en particulier des techniques de marquage avec l'eau deutériée (2H2O) [Messmer *et al.*, 2005]. Ces études ont révélé que les cellules de LLC sont plus dynamiques que ce qui avait été initialement décrit. Le taux de croissance, compris entre 0,1% à plus de 1% du clone par jour, conduit à évaluer que 10^9 à 10^{10} nouvelles cellules leucémiques sont fabriquées chaque jour pour un patient qui a approximativement 10^{12} cellules leucémiques ; ces taux de division cellulaire sont suffisants pour permettre l'apparition de nouveaux clones. Il existe donc une association entre le taux de croissance cellulaire et la progression de la maladie. Par conséquent, **le temps de doublement de la lymphocytose** est significatif cliniquement, car il reflète la capacité proliférative des cellules leucémiques, ainsi que leur potentiel à promouvoir la survenue de lésions de l'ADN [Montserrat *et al.*, 1986 ; Pepper *et*

al., 2012]. Ceci peut également expliquer pourquoi les **télomères**, qui raccourcissent à chaque division cellulaire, sont plus courts chez les patients appartenants aux sous-groupes de LLC avec des évolutions péjoratives [Roos *et al.*, 2008].

2.6. Anomalies génétiques au cours de la LLC

2.6.1. Anomalies chromosomiques

Par comparaison avec les autres lymphomes B, les translocations réciproques équilibrées sont remarquablement rares au cours de la LLC [Döhner *et al.*, 2000]. La LLC est à l'inverse caractérisée par des **anomalies chromosomiques déséquilibrées**, en particulier des délétions et des amplifications, dont les plus fréquentes sont les délétions 13q, 11q, 17p et la trisomie 12. Leurs caractéristiques cytogénétiques et conséquences physiopathologiques sont détaillées ci-dessous (*Données Bibliographiques – Chapitre 5*).

Le **faible nombre de translocations réciproques équilibrées** impliquant les locus des gènes des chaînes lourdes ou légères des gènes des immunoglobulines (Ig) suggère que la cellule originelle n'est pas centro-germinative, mais plutôt post-centre germinatif ou indépendante du centre germinatif, si bien qu'elle est préservée des phénomènes de remodelage des locus des gènes des immunoglobulines nécessaires aux hypermutations somatique et la commutation de classe, phénomènes qui favorisent les cassures doubles brins et les translocations chromosomiques impliquant les Ig [Klein *et al.*, 2010]. A l'inverse, les aberrations génomiques conduisant à la transformation oncogénique semblent survenir après ces phénomènes, probablement durant la prolifération des cellules B induite par l'antigène (**Figure 2**). De la même façon, la leucémie à tricholeucocytes, dérivant elle-aussi des cellules B post-centre germinatif ayant expérimenté l'antigène, se distingue des autres lymphoproliférations B par l'absence de translocations réciproques équilibrées [Haglung *et al.*, 1994].

2.6.2. Phénomènes mutationnels

Les hypermutations somatiques permettent physiologiquement la substitution nucléotidique dans les régions variables des gènes des immunoglobulines des cellules B du centre germinatif, afin d'augmenter l'affinité d'un anticorps pour un antigène spécifique. Des **hypermutations somatiques aberrantes** (ASHM) ont également été décrites : elles induisent des mutations multiples des séquences codantes de proto-oncogènes impliqués dans la lymphomagenèse, comme *C-MYC* ou *PAX5*. De façon intéressante, ces ASHM ne sont pas

observées au cours de la LLC, alors qu'elles constituent un mécanisme commun à l'origine des lésions génétiques des lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL) [Khodabakhshi *et al.*, 2012].

Les approches de séquençage haut-débit montrent d'ailleurs que le **nombre de mutations récurrentes est relativement faible** dans la LLC, de l'ordre de 4 à 20 selon les études [Puente *et al.*, 2011 ; Fabbri *et al.*, 2011 ; Landau *et al.*, 2013]. Au cours des DLBCL, le nombre de mutations récurrentes est bien supérieur (322 gènes dans l'étude récente de Zhang *et al.*, 2013) avec un nombre moyen de mutations par patients de l'ordre de 16, ce qui traduit l'hétérogénéité génétique au sein de ces pathologies [Zhang *et al.*, 2013].

2.6.3. Longueur des télomères

De façon intéressante, il existe une **corrélation entre absence de mutation des gènes IgV_H et télomères courts** ; cette relation pourrait refléter la longueur initiale des télomères de la cellule originelle. En effet, les cellules B normales présentent physiologiquement une activation de la télomérase qui rallonge les télomères lors du passage dans le centre germinatif. Ainsi, les cellules mutées pour les IgV_H ont logiquement des télomères plus longs que les cellules non mutées. De plus, Sellman *et al.* [2011] a récemment démontré que la longueur des télomères ne diminue pas de façon significative au cours du temps ou après traitement. Les résultats de Lin *et al.*, [2010] montrent également l'absence de variations significatives dans la longueur des télomères entre patients précédemment traités ou non.

Cependant, pour d'autres auteurs, l'existence de télomères courts dans des cellules de LLC démontre indirectement qu'il existe une **division cellulaire significative** lors de la progression de la maladie. Ceci est illustré par l'association entre forte expression de *hTERT* et temps de doublement de la lymphocytose inférieur à 6 mois dans l'étude de Rampazzo *et al.* [2012] ; cependant, il est important de préciser que cette association n'est pas statistiquement significative dans cette série.

Dans un cas comme dans l'autre, ce raccourcissement des télomères parmi les LLC non mutées peut rendre compte de l'existence d'une **instabilité génomique** -reflétée par une fréquence plus élevée d'anomalies génomiques complexes- et par conséquent du pronostic plus péjoratif de ces patients [Haferlach *et al.*, 2007 ; Roos *et al.*, 2008 ; Rampazzo *et al.*, 2012].

2-7. Conclusion

En dépit des considérables avancées dans la compréhension des mécanismes du fonctionnement de la cellule leucémique, la physiopathologie de la LLC reste à explorer. Le concept de maladie accumulative de cellules B fixées en stade G0/G1 du cycle cellulaire, qui serait liée à un défaut d'apoptose, est rapidement apparu insuffisante devant l'émergence de multiples interrogations et l'incapacité à définir de façon univoque la nature de ce défaut. En effet, la mise en évidence d'une évolution clonale et d'une instabilité génomique traduisant l'existence d'une part proliférative au sein de la population leucémique, la sensibilité des cellules aux signaux délivrés par le microenvironnement et enfin la multiplicité des évolutions cliniques laissent supposer des mécanismes intriqués et complexes.

Parmi ces mécanismes, nous avons choisi d'étudier **2 axes physiopathologiques** :

1/ les anomalies de l'apoptose, en particulier l'expression et la régulation du **gène anti-apoptotique *MCL1***,

2/ l'instabilité génomique, en rapport avec **la fonction télomérique** et le **statut *TP53***.

Les données bibliographiques de chacun de ces domaines physiopathologiques sont détaillées ci-dessous.

3- ROLES DES GENES ANTI-APOPTOTIQUES

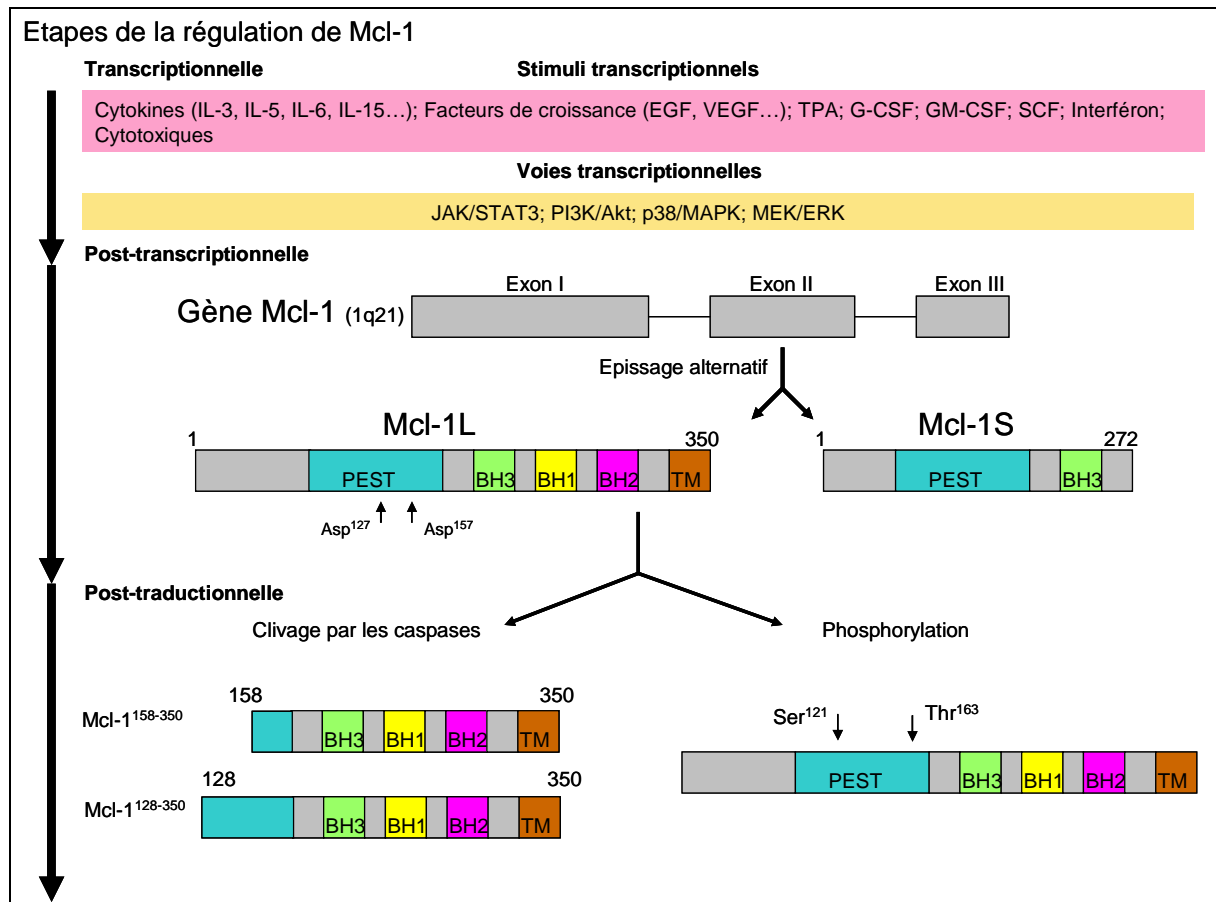
MCL1, IL6 ET VEGF

3.1. Myeloid Cell Leukemia 1 (*MCL1*)

3.1.1. Gène et protéine *MCL1*

Ce gène *MCL1* a été initialement identifié comme un gène induit de façon précoce par une exposition à du TPA dans une lignée de cellules leucémiques myéloïdes humaines ML-1 ; le TPA provoque une régulation positive de *MCL1* et entraîne la différenciation des cellules ML-1 qui, de myéloblastes immatures, deviennent des monocytes ou macrophages matures [Revue par Craig, 2002]. Ainsi, l'expression de *MCL1* est requise pour maintenir la viabilité cellulaire et promouvoir la différenciation cellulaire, alors que la diminution d'expression de *MCL1* induit l'apoptose des cellules ML-1 [Kozopas *et al.*, 1993]. Cette protéine est également essentielle pour l'embryogenèse, l'inactivation du gène empêchant le développement préimplantatoire et l'implantation de l'embryon [Rinkenberger *et al.*, 2000]. A l'inverse, la surexpression de *MCL1* chez des souris transgéniques accélère la croissance des cellules hématopoïétiques et entraîne une immortalisation des cellules de la lignée myéloïde [Zhou *et al.*, 1998]. La protéine *MCL1* est également exprimée abondamment dans le compartiment de cellules B du centre germinatif, où elle est indispensable au développement et au maintien des lymphocytes B et T [Opferman *et al.*, 2003]. De plus, *MCL1* module la progression dans le cycle cellulaire [Fujise *et al.*, 2000]. En définitive, en raison de sa large expression dans les tissus humains et de ses effets sur l'apoptose, la différenciation et le cycle cellulaire, *MCL1* est un oncogène qui favorise la tumorigenèse, la protection envers l'apoptose et la résistance des cellules au traitement. Une dysfonction de la régulation, de l'expression ou de la dégradation de *MCL1* est observée dans de nombreuses néoplasies (cancers de l'ovaire, de la prostate, de l'estomac, du sein, mélanomes, sarcomes, cholangiocarcinome...) ainsi que dans certaines hémopathies dont le myélome multiple [Le Gouill *et al.*, 2004] et la LLC [Saxena *et al.*, 2004 ; Pedersen *et al.*, 2002].

Figure 6 : Structure du gène MCL1 et mécanismes de régulation de son expression,
d'après Le Gouill *et al.*, 2004



Ce gène est situé sur le chromosome 1 en q21 et comprend trois exons (**Figure 6**). La **protéine classique MCL1L** est constituée de 350 acides aminés et contient 3 domaines d'Homologie à BCL2 (domaines BH allant de BH1 à BH3) impliqués dans les interactions entre protéines de la famille BCL2 et jouant un rôle important pour la régulation de l'apoptose, ainsi qu'un domaine transmembranaire, permettant entre autre sa localisation sur la membrane mitochondriale externe, mais aussi au niveau du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire. Contrairement aux autres membres de la famille BCL2, MCL1 a un domaine N-terminal étendu contenant 2 séquences PEST [Kozopas *et al.*, 1993]. Ces domaines PEST sont associés à un *turn-over* rapide de la protéine, via une dégradation par le protéasome, avec une demi-vie de la protéine MCL1 estimée entre 30 minutes et 3h. Cette régulation rapide permet une réponse adaptée aux changements environnementaux. La diminution d'expression de MCL1 est un point de contrôle central des événements de l'apoptose mitochondriale et précède le relargage du cytochrome C et l'activation des caspases [Nijhawan *et al.*, 2003 ; Zhou *et al.*, 1997]. A l'inverse, la surexpression de MCL1 retarde l'apoptose induite par divers agents tels que la surexpression de c-MYC ou la privation de facteurs de croissance [Chao *et al.*, 1998 ; Reynolds *et al.*, 1994]. MCL1 empêche l'apoptose en se liant aux protéines pro-apoptotiques de la famille BCL2 comme BIM ou BAK par exemple ; la formation d'hétérodimères avec ces protéines entraîne alors leur neutralisation.

3.1.2. Mécanismes de régulation de l'expression de MCL1

La **régulation transcriptionnelle** de MCL1 dépend du type cellulaire et est modulée par des signaux de survie ou de différenciation comme les cytokines (IL-3, IL-5, IL6 et IL-15), les facteurs de croissance (VEGF, EGF), les facteurs stimulant les colonies (G-CSF, GM-CSF, SCF), l'interféron (IFN) et le TPA. MCL1 est également induit par des stimulus pro-apoptotiques comme les radiations ou certains traitements cytotoxiques (**Figure 6**). La voie JAK/STAT, la voie de p38/MAPK, la voie MEK/ERK et la voie de la PI3K ont toutes été impliquées, seules ou en combinaison, dans la stimulation de la transcription du gène *MCL1* par l'intermédiaire d'un élément spécifique de réponse aux facteurs de transcription situé dans son promoteur [Craig *et al.*, 2002].

Sur un plan **post-transcriptionnel**, MCL1 subit un épissage alternatif de l'exon 2 aboutissant à une deuxième isoforme, MCL1S/ Δ TM. La partie N-terminale de la protéine de

271 acides aminés (comprenant les domaines PEST et BH3) reste identique à MCL1L, mais MCL1S/ Δ TM perd les domaines BH1, BH2 et la région transmembranaire [Bae *et al.*, 2000 ; Bingle *et al.*, 2000]. En opposition avec MCL1L, la surexpression de MCL1S/ Δ TM a un effet pro-apoptotique [Michels *et al.*, 2005]. Les deux isoformes de MCL1 peuvent en effet s'hétérodimériser et se neutraliser.

MCL1 peut aussi faire l'objet d'une **régulation post-traductionnelle**. Ainsi, la phosphorylation directe de MCL1 joue un rôle dans le contrôle de l'expression et de la fonction de MCL1 : dans les cellules ML-1, le TPA active la voie MEK/ERK et provoque la phosphorylation de MCL1 sur la Thr¹⁶³, ce qui ralentit le turn-over de MCL1 et favorise de cette façon la survie cellulaire. Cependant, la phosphorylation de sites additionnels entraîne au contraire la mort cellulaire [Inoshita *et al.*, 2002 ; Domina *et al.*, 2004]. Par ailleurs, l'expression de MCL1 est régulé négativement durant l'apoptose, contrairement aux autres protéines anti-apoptotiques BCL2 et BCLXL, et cette régulation post-transcriptionnelle survient notamment par le biais des caspases qui clivent la protéine au sein des domaines PEST (sur les résidus Asp¹²⁷ et Asp¹⁵⁷), ce qui génère parallèlement un fragment C-terminal à l'effet pro-apoptotique puissant [Craig *et al.*, 2002]. De plus, ce fragment pro-apoptotique pourrait participer une boucle de rétrocontrôle positif perpétuant l'activation des caspases. On voit que la phosphorylation et le clivage par les caspases interviennent au sein des domaines PEST, soulignant le rôle fondamental de ces séquences.

MCL1 a donc une structure unique au sein de la famille BCL2, et l'association de domaines PEST, d'une demi-vie courte et de sa capacité de liaison à diverses protéines pro-apoptotiques rend compte de son rôle « de première ligne » dans la régulation de l'homéostasie cellulaire et de la réponse aux stimulus extracellulaires.

3.1.3. Expression de MCL1 au cours de la LLC

Les lymphocytes de LLC présentent un défaut d'apoptose entraînant une accumulation de cellules *in vivo* ; cependant, *in vitro*, ces cellules rentrent rapidement en apoptose, ce qui souligne le rôle majeur des signaux de survie émanant du microenvironnement dans la dérégulation de l'apoptose au cours de la LLC. Lorsqu'ils sont

co-cultivés avec une lignée de cellules dendritiques folliculaires HK, on observe une prolongation stable de la survie de ces lymphocytes de LLC. Cette survie *in vitro* est associée à une expression augmentée de MCL1 ; l'usage de séquences antisens supprime cette protection envers l'apoptose. L'existence d'un contact intercellulaire est nécessaire à l'obtention de cette protection envers l'apoptose induite par les cellules HK, et l'introduction de divers anticorps neutralisant dirigés contre des molécules d'adhésion montre que le CD44 est impliqué dans cette prolongation de la survie lymphocytaire [Pedersen *et al.*, 2002].

Sur un plan clinique dans la LLC, l'expression augmentée de MCL1 -déterminée par Western Blot chez 51 patients auparavant non traités- a été associée à l'absence de rémission complète après traitement cytotoxique, sans corrélation au stade selon Rai. A l'inverse, une expression faible de MCL1 semble être nécessaire à l'obtention d'une rémission complète après traitement [Saxena *et al.*, 2004]. Un travail antérieur avait également évalué l'expression de MCL1 par Western Blot dans le sang périphérique de 58 patients non traités : des niveaux élevés de la protéine MCL1 sont corrélés à l'absence d'obtention de rémission complète après traitement par chlorambucil ou fludarabine [Kitada *et al.*, 1998].

Au total, *MCL1* est un gène de survie qui semble être impliqué dans la résistance à l'apoptose des lymphocytes de LLC et dans la réponse au traitement. De nombreux facteurs entrent en jeu dans la régulation de son expression, parmi lesquels une cytokine, *l'IL6*, et un facteur de croissance angiogénique, *VEGF*.

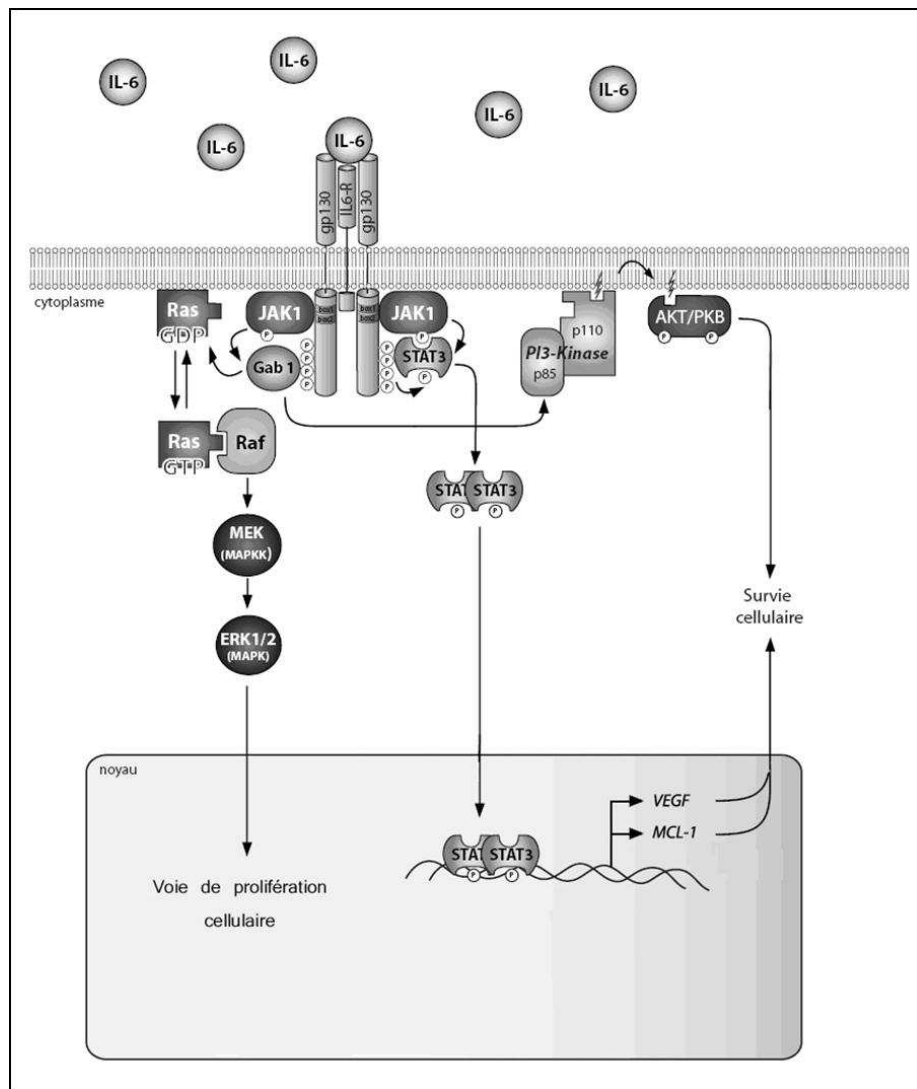
3.2. Interleukine-6 (IL6)

3.2.1. Gène et protéine IL6

Le gène codant l'IL6 se situe en 7p21-p14 et comprend 5 exons. Il code un ARN messager de 1,3 kb. L'IL6 est un polypeptide de 184 acides aminés et de masse moléculaire de 21 kDa. Cette protéine sécrétoire est synthétisée sous forme d'un précurseur de 212 résidus doté d'un peptide signal N-terminal.

L'IL6 est une cytokine multifactorielle identifiée à l'origine comme une protéine capable de stimuler la production d'anticorps par les plasmocytes ; elle joue également un rôle important dans la régulation de l'hématopoïèse, l'inflammation, le métabolisme osseux et le développement neuronal. Elle n'est pas produite de façon constitutive dans des conditions

Figure 7 : Représentation schématique des voies de transduction du signal induit par l'IL6



basales, mais son expression est induite par divers stimulus, comme une infection virale ou une exposition à d'autres cytokines ou facteurs de croissance, telles que l'IL-1, l'IL-3, le TNF- α , le PDGF, et le GM-CSF.

3.2.2. Transduction du signal induit par l'IL6

Les récepteurs impliqués dans la reconnaissance de l'IL6 sont de 2 types (**Figure 7**) [Heinrich *et al.*, 1998] : *i/* le **récepteur α** (IL6R- α) qui n'est pas impliqué dans la transduction du signal ; c'est une protéine membranaire qui existe également sous forme soluble. L'IL6 se lie spécifiquement à ce récepteur ; *ii/* la **protéine gp130** qui est le récepteur transducteur de signal. Elle est recrutée par le complexe IL6-récepteur α , qui entraîne son homodimérisation.

La transduction du signal implique la mise en jeu de 2 voies principales : la voie **JAK/STAT** et la cascade des **MAPK** (**Figure 7**). La voie de la **PI3K** peut également être activée.

Les kinases JAK1, JAK2 et TYK2, associées à la gp130, sont activées par la liaison de l'IL6 au récepteur ; l'extrémité cytoplasmique de la gp130 est phosphorylée sur des résidus tyrosines, qui sont des sites d'amarrage des STATs (principalement STAT3 et STAT1). Les STATs sont alors phosphorylés sur des résidus tyrosine, ils s'hétérodimérisent et sont transloqués activement dans le noyau pour réguler la transcription de gènes cibles, comme **les gènes de prolifération et de survie cellulaire, dont par exemple MCL1 et VEGF**, ou encore c-MYC, cycline D1, BCLXL et Survivine [Puthier *et al.*, 1999 (a) ; Xu *et al.*, 2005].

La gp130 phosphorylée recrute également la protéine SHP2, qui elle-même est phosphorylée par JAK1 ; SHP2 activée se lie au complexe GRB2/SOS et /ou à GAB1 [Schaper *et al.*, 1998]. Le recrutement de SOS près de la membrane plasmique permet l'activation de Ras, qui à son tour stimule la cascade RAS-RAF-MAPK. Gab1 est également impliquée dans l'activation de cette cascade. L'IL6 active ERK1 et ERK2, des MAPK connues pour leurs effets sur le maintien de la survie cellulaire, mais également p38 et JNK, les MAPK activées par le stress, la cascade des MAPK étant globalement une voie de **prolifération cellulaire** [Zauberman *et al.*, 1999].

L'IL6 peut activer une cascade supplémentaire impliquant la PI3K : cette enzyme modifie certains phosphoinositides, de sorte que la sérine/thréonine PKB/AKT est recrutée à la membrane plasmique et phosphorylée par la protéine PDK1. Les substrats d'AKT sont entre autre le facteur de transcription FKHR et le facteur pro-apoptotique BAD, dont la phosphorylation est associée avec une survie cellulaire prolongée et une stimulation de la croissance cellulaire.

3.2.3. Mécanismes d'action de l'IL6 et régulation du gène *MCL1*

Il est important de noter que l'IL6 pourrait être impliquée dans la régulation de *MCL1*. En effet, l'expression de *MCL1* est inductible par l'IL6 dans des lignées cellulaires de myélome et dans des cellules myélomateuses hautement purifiées [Puthier *et al.*, 1999 (b)] ; il a été ensuite démontré que cette régulation met en jeu la voie JAK2/STAT3 dans ces cellules myélomateuses. En effet, STAT3 phosphorylé se dimérise et est alors transloqué dans le noyau où il induit l'expression de *MCL1* par l'intermédiaire d'éléments de réponse situé dans le promoteur du gène [Puthier *et al.*, 1999 (a)]. Bien que l'effet anti-apoptotique de l'IL6 soit médié par *MCL1*, une régulation positive de *MCL1* survenant indépendamment de l'IL6 protège également la cellule myélomateuse de l'apoptose [Jourdan *et al.*, 2003]. Par ailleurs, l'induction de *MCL1* par l'IL6 dans des lignées de myélome ne suffirait pas seule à bloquer l'apoptose [Brocke-Heidrich *et al.*, 2004]. De plus, *MCL1* interviendrait également dans la prolifération cellulaire induite par l'IL6, puisque le travail de Le Gouill *et al.* [2004] a montré que l'IL6 ne peut pas induire la prolifération de fibroblastes embryonnaires murins *MCL1*^{Δ^{nul}}. Plus récemment, Isomoto *et al.* [2005] a montré dans des lignées cellulaires de cholangiocarcinome humain l'existence d'une activation constitutive de STAT3 dépendante de l'IL6, cette cascade IL6/STAT3 induisant la transcription de *MCL1* par l'intermédiaire d'un élément de réponse à STAT3 situé dans le promoteur de *MCL1*.

Concernant la LLC, les cellules endothéliales produisent une forme dimérique d'IL6 qui inhibe l'apoptose des lymphocytes de LLC par un mécanisme paracrine [Moreno *et al.*, 2001]. Par ailleurs, Freeman *et al.* [1989] a montré une expression du gène de l'IL6 très faible dans les lymphocytes B normaux, alors que l'étude de Biondi *et al.* retrouve une expression constitutive d'IL6 dans des lymphocytes de LLC, avec production d'une protéine biologiquement active [Biondi *et al.*, 1989]. Enfin, le travail de Lavabre-Bertrand *et al.* [1995] retrouve l'expression de l'IL6R chez la majorité des patients porteurs de LLC (18 sur 26 patients). Ces données suggèrent un mécanisme d'action de l'IL6 de type paracrine mais

aussi autocrine dans la LLC.

3.2.4. Expression d'IL6 dans les pathologies tumorales : données cliniques

Sur un plan clinique, il est clairement démontré que la plupart des **tumeurs gliales** produit de l'IL6. L'IL6 est surexprimée dans les gliomes humains en raison d'une amplification de son gène ; cette surexpression est corrélée à l'agressivité de la tumeur [Tchirkov *et al.*, 2001]. De plus, les lignées cellulaires de glioblastome humain produisant constitutivement de l'IL6 sont hautement radiorésistantes [Dubost *et al.*, 2002].

Par ailleurs, différents travaux sur des **lignées tumorales humaines** (prostate, rein, mélanome) ont montré une corrélation entre la production d'IL6 et la résistance à divers cytostatiques [Borsellino *et al.*, 1995 ; Mitzutani *et al.*, 1995 ; Lu *et al.*, 1996]. De plus, la neutralisation de cette cytokine par anticorps ou séquence antisens induit une chimiosensibilité aux mêmes drogues via une induction de l'apoptose [Mitzutani *et al.*, 1995 ; Lanza *et al.*, 1999]. Il a été montré récemment que l'action anti-apoptotique de l'IL6 était le résultat d'une activation de la voie STAT3 dans le cancer de l'œsophage [Leu *et al.*, 2003].

L'IL6 est donc un **facteur de survie cellulaire impliqué dans l'agressivité tumorale et la résistance des cellules néoplasiques aux traitements.**

Plusieurs études ont précédemment suggéré un rôle possible d'une production anormale d'IL6 dans les **lymphopathies B**. Par exemple, l'ARN messager de l'IL6 et la protéine ont été mis en évidence dans des cellules lymphomateuses par des techniques d'immunohistochimie, et leur degré de positivité est corrélé au taux de prolifération des cellules malignes [Yee *et al.*, 1989 ; Muller *et al.*, 1992]. L'expression d'IL6 exogène dans des cellules humaines infectées par l'EBV leur confère un avantage prolifératif et un caractère tumorigène [Scala *et al.*, 1990] ; enfin, chez les souris transgéniques, la surexpression d'IL6 est associée au développement de lymphomes [Woodroffe *et al.*, 1992].

Des niveaux sériques élevés d'IL6 sont corrélés à un risque augmenté de développement de **lymphomes** chez des patients atteints de SIDA et chez des transplantés rénaux [Tosato *et al.*, 1993]. De plus, l'élévation de l'IL6 sérique dans les lymphomes diffus à grandes cellules est associée à des caractéristiques pronostiques péjoratives, comme une survie sans rechute et une survie globale plus courte [Seymour *et al.*, 1995]. Elle peut aussi être élevée et être corrélée à un mauvais pronostic dans la maladie de Hodgkin [Kurzrock *et al.* 1993] et dans les lymphomes non hodgkinien de bas grade [Fayad *et al.*, 1998].

Dans le **myélome multiple**, les taux sériques d'IL6 et d'IL6R sont des facteurs de pronostic reflétant la fraction proliférative des cellules tumorales ; la sécrétion d'IL6 est autocrine par les cellules myélomateuses, mais aussi paracrine par les cellules stromales de la moelle osseuse [Hideshima *et al.*, 2004].

3.2.5. Expression d'IL6 dans la LLC : données cliniques

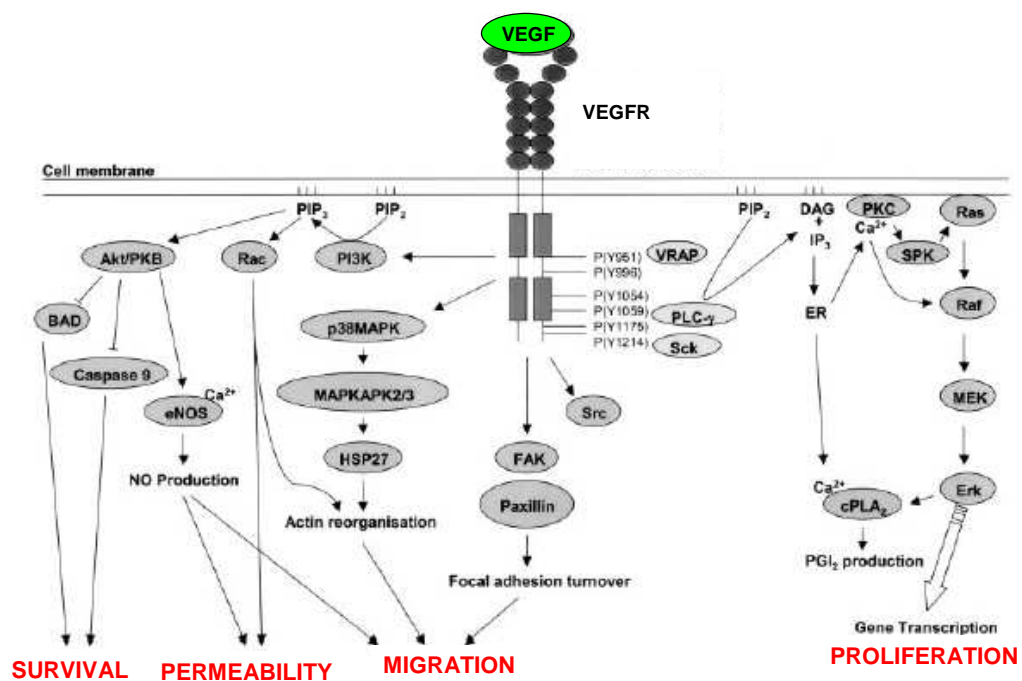
Avant notre travail, deux études cliniques ont évalué l'intérêt pronostique des taux d'IL6 sériques dans la LLC.

Fayad *et al.* a mesuré l'IL6 sérique par technique ELISA chez 151 patients atteints de LLC [Fayad *et al.*, 2001] : 36 patients (24%) ont une valeur d'IL6 au dessus de la norme. Ces niveaux sériques élevés sont corrélés aux stades III et IV de la maladie selon Rai, à la réalisation d'un traitement antérieur, à des taux augmentés de β 2microglobuline (≥ 2 mg/l), à des taux élevés de LDH et à l'âge (≥ 60 ans). Pour 15 de ces patients ayant un taux initial d'IL6 élevé, des échantillons sériques prélevés lors d'une rémission complète (3 mois après le dernier traitement) montrent une normalisation de l'IL6 sérique. De plus, les niveaux d'IL6 sérique montrent une corrélation significative à la survie globale, avec une survie diminuée pour les patients ayant des taux d'IL6 augmentés. Dans cette étude, les cellules leucémiques ne semblent pas être la source d'IL6 (mesurée par cytométrie en flux).

Une seconde étude a mesuré l'IL6 sérique par ELISA chez 100 patients atteints de LLC [Lai *et al.*, 2002]. Là aussi, les patients en stade III ou IV selon Rai présentent des taux d'IL6 significativement plus élevés que les patients en stade 0, I ou II. L'augmentation du taux sérique d'IL6 est également corrélée à une élévation de la β 2-microglobuline ($> 3,5$ mg/L), à l'âge (> 60 ans), au degré d'anémie et à la leucocytose. Par contre, il n'y a pas de corrélation avec la numération plaquettaire ni avec les anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic. Enfin, l'expression d'IL6 est un élément prédictif de la survie chez les patients ayant des stades avancés de la maladie.

Au total, l'IL6 est un facteur anti-apoptotique jouant un rôle dans la survie cellulaire de nombreuses tumeurs solides et hémopathies, et qui semble corrélé à l'agressivité de la maladie et à la survie globale dans la LLC. Cette cytokine intervient en outre dans la régulation de l'expression de *MCL1*.

Figure 8 : Transduction du signal induit par VEGF, d'après Hoeben *et al.*, 2004



3.3. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

3.3.1. Gène et protéine VEGF

VEGF est un gène codant une glycoprotéine homodimérique agissant comme facteur de croissance de l'endothélium vasculaire et induisant la migration et la prolifération des cellules endothéliales. Cette protéine est largement exprimée dans les tissus humains normaux.

Le gène codant VEGF se situe en 6p21.3 et comprend 8 exons et 7 introns. Par épissage alternatif, VEGF donne 9 formes moléculaires différentes : VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF_{165b}, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆ ; la région N-terminale de liaison à VEGFR, codée par les exons 1 à 5, est commune à toutes ces isoformes. L'isoforme VEGF₁₆₅ est physiologiquement la plus abondante [Ferrara, 1996] ; elle se lie aux différents récepteurs à VEGF avec une affinité plus importante pour VEGFR2.

L'hypoxie, le stress cellulaire et des conditions pro-inflammatoires sont autant de facteurs induisant *VEGF*. Notons que les conditions pro-inflammatoires font intervenir des cytokines, dont l'IL6.

3.3.2. Transduction du signal induit par VEGF

Il y a trois récepteurs à VEGF connus, qui appartiennent tous à la famille des récepteurs tyrosine kinase : **VEGFR1**, **VEGFR2** et **VEGFR3** [Ferrara *et al.*, 2003]. VEGFR1 se lie à VEGF avec une affinité 10 fois supérieure à celle de VEGFR2, mais sa capacité de signalisation est faible. On considère que VEGFR2 est le récepteur le plus important qui entraîne la transduction du signal de VEGF dans les cellules endothéliales. VEGFR3 contrôle le développement et la croissance du système lymphatique ; ce récepteur est retrouvé principalement dans l'endothélium des vaisseaux lymphatiques [Karkkainen *et al.*, 2000].

Lorsque VEGF se lie à VEGFR2, le récepteur s'autophosphoryle sur divers résidus tyrosine (**Figure 8**) [Hoeben *et al.*, 2004 ; Claesson-Welsh & Welsh, 2013]. Parmi celles-ci, 1175-Tyr-P est le site de liaison du domaine SH2 de la Phospholipase C γ (PLC γ), qui est elle-même phosphorylée sur des tyrosines et qui active ensuite en aval la voie des MAP kinases comprenant la protéine kinase C (PKC), c-RAF, MEK et ERK. Contrairement aux autres représentants de la famille des récepteurs tyrosine kinase, VEGFR2 n'active que très peu la protéine RAS. De la même façon, la présence du ligand induit la phosphorylation de VEGFR1 sur divers résidus tyrosine, mais la voie de signalisation en aval reste méconnue,

même si la voie de la PI3K semble en cause dans certaines conditions.

3.3.3. Mécanismes d'action de VEGF et régulation du gène MCL1

De nombreuses tumeurs solides, comme les cancers du sein, du poumon, du colon, de la prostate et les gliomes secrètent VEGF, ce qui entraîne la formation de « *clusters* » de capillaires autour des cellules produisant cette protéine [Claesson-Welsh & Welsh, 2013]. VEGF a dans ce contexte un rôle **pro-angiogénique selon un mécanisme d'action paracrine** [Gerber & Ferrara, 2003]. L'angiogenèse tumorale et la croissance tumorale qui en découle sont inhibées *in vivo* par des anticorps dirigés contre VEGF, par des récepteurs solubles à VEGF et par l'expression de récepteurs Flk-1 dominant-négatifs [Kim *et al.*, 1993 ; Kendall & Thomas, 1993 ; Millauer *et al.*, 1994]. Ces constatations ont montré l'importance de l'étude des fonctions de VEGF dans la compréhension de l'angiogenèse des tumeurs solides. Des travaux ont également suggéré que l'angiogenèse serait impliquée dans la pathogenèse de certaines hémopathies. Par exemple, une étude sur 88 patients porteurs de lymphomes à cellules B a montré une augmentation de densité des microvaisseaux dans les ganglions pathologiques qui est corrélée à la sévérité de la maladie [Ribatti *et al.*, 1996]. Un autre travail a révélé une augmentation du nombre des microvaisseaux dans la moelle d'enfants porteurs de leucémie aiguë lymphoblastique, en comparaison au tissu normal [Perez-Atayde *et al.*, 1997]. Néanmoins, dans la LLC, il n'a pas été mis en évidence d'augmentation de la vascularisation de la moelle osseuse dans une série de 32 patients par rapport au tissu sain [Aguayo *et al.*, 2000].

Outre son rôle dans l'angiogenèse, VEGF a également été reconnu comme **facteur de survie** pour divers types cellulaires. Il a été démontré que VEGF régule la survie des cellules souches hématopoïétiques par un **mécanisme d'action autocrine** [Gerber *et al.*, 2002]. Gerber *et al.* rapporte également que VEGF protège des lignées de cellules endothéliales de veine ombilicale de l'apoptose induite par la privation de sérum, ce qui s'accompagne d'une augmentation d'expression significative des protéines anti-apoptotiques BCL2 et A1 par l'intermédiaire du récepteur VEGFR2 et la voie de la PI3K/Akt [Gerber *et al.*, 1998 (a) et 1998 (b)]. Nor *et al.* [1999] a observé que des cellules endothéliales de microvaisseaux du derme humain cultivés sur des gels de collagène de type I présentent une réduction significative de l'apoptose en présence de VEGF. Là aussi, la survie cellulaire prolongée s'associe à une augmentation dose-dépendante de l'expression de BCL2. Enfin, Le Gouill *et al.* [2004] a démontré que VEGF induit une prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose de

cellules myélomateuses par l'intermédiaire d'une augmentation d'expression de *MCL1*.

Les **cellules de LLC** produisent et sécrètent VEGF in vitro et in vivo [Chen *et al.*, 2000 ; Bairey *et al.*, 2001] et les trois types de récepteurs à VEGF sont exprimés par ces lymphocytes pathologiques [Bairey *et al.*, 2004]. Cette expression combinée de VEGF et de ses récepteurs suggère fortement dans cette pathologie un mécanisme d'action **autocrine**. Les résultats de Lee *et al.* sont également en faveur d'une **boucle d'action autocrine de VEGF dans la LLC** [Lee *et al.*, 2004]. En effet, les auteurs démontrent que la présence dans le milieu de culture de VEGF recombinant protège les lymphocytes de LLC de l'apoptose. En outre, l'addition de VEGF entraîne une augmentation significative de l'expression des protéines anti-apoptotiques MCL1 et XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein).

3.3.4. Expression de VEGF dans les pathologies tumorales : données cliniques

Dans les cancers bronchiques non à petites cellules, une expression forte de la protéine VEGF (déterminée par immunomarquage) est corrélée à une survie sans rechute et à une survie globale raccourcie chez les patients porteurs de formes précoces de la maladie [Yilmaz *et al.*, 2007]. Dans le carcinome épidermoïde de l'œsophage, l'expression de VEGF par la tumeur est associée à la présence de ganglions lymphatiques métastatiques [Han *et al.* 2007], tout comme dans le cancer du sein [Nakamura *et al.*, 2003]. De la même façon, une expression forte de VEGF est un marqueur du pronostic dans le cancer colorectal, corrélé à la présence de métastases et à une survie globale plus courte [Hu *et al.*, 2007].

3.3.5. Expression de VEGF dans la LLC : données cliniques

Sur un plan clinique, il a été démontré que les niveaux de VEGF plasmatiques mesurés par ELISA sont significativement augmentés dans la LLC par rapport aux patients contrôle [Aguayo *et al.*, 2000 ; Smolej *et al.*, 2006]. Des taux élevés de VEGF sérique seraient même prédictifs du risque de progression des LLC précoces sur une série de 41 patients en stade A selon Binet [Molica *et al.*, 1999]. Plus récemment, il a été montré que les niveaux de VEGF circulant sont corrélés à l'expression de ZAP-70, à l'expression de CD38 et au statut mutationnel des IgVH dans une série de 47 patients [Molica *et al.*, 2007]. Ces résultats ne concordent pas avec ceux de Smolej *et al.* [2006] qui ne retrouve pas de différence de VEGF plasmatique entre les patients mutés et non mutés (n=49).

Un autre travail s'est intéressé aux niveaux de VEGF cellulaire mesurés par Western-Blot et radio-immunologie chez 225 patients : aucune corrélation n'a été retrouvée avec le stade de la maladie ou le taux de β 2M [Aguayo *et al.*, 2000]. Il est intéressant de noter que Bairey *et al.* ne retrouve pas de corrélation entre les taux de VEGF sériques et cellulaires dans une série de 85 patients [Bayrey *et al.*, 2001].

Au total, ces données suggèrent que *VEGF* est non seulement un gène à effet pro-angiogénique, mais est aussi un gène de survie cellulaire agissant selon un mécanisme autocrine et qui semble être impliqué dans la survie des lymphocytes pathologiques de LLC en intervenant -entre autres- dans la régulation de l'expression de *MCL1*. Par ailleurs, le niveau de la protéine VEGF semble être corrélé avec la progression de la maladie.

<p>L'un des objectifs de notre travail est d'évaluer la valeur pronostique de l'expression du gène anti-apoptotique <i>MCL1</i> et de préciser les mécanismes de la régulation de son expression, notamment en recherchant des corrélations entre l'expression des gènes <i>MCL1</i>, <i>IL6</i> et <i>VEGF</i>.</p>

4. TELOMERES ET INSTABILITE GENOMIQUE

4.1. Définition et fonctions des télomères

Les extrémités des chromosomes eucaryotes linéaires sont appelés télomères. Ces télomères assurent la **protection -ou « capping »- des extrémités chromosomiques**, et par conséquent de l'intégrité du génome. L'un de leur rôle majeur, découvert dès la fin des années 30 par Barbara McClintock et Herman Muller à partir de l'étude du comportement des chromosomes [revue de la littérature par Gall *et al.*, 1995], est de permettre à la cellule de distinguer les extrémités chromosomiques normales des cassures chromosomiques, ce qui évite la survenue de phénomènes de réparations aberrants, en particulier de fusion d'une extrémité chromosomique et d'une cassure double-brin, ou de fusion d'extrémités chromosomiques entre elles. D'autre part, la présence de télomères empêche la dégradation des extrémités chromosomiques par des nucléases, les phénomènes de recombinaison au niveau ou à proximité du télomère, et permet de réguler la maintenance des télomères par la télomérase [Blackburn *et al.*, 2001].

Les télomères interviennent également dans la **régulation de la transcription** des gènes situés à proximité par un phénomène nommé « effet de position télomérique » [Baur *et al.*, 2001]. La présence de modifications des histones de la chromatine subtélomérique indique que cette répression transcriptionnelle est de nature épigénétique.

D'autre part, il a été récemment découvert que l'ADN télomérique est transcrit, au moins chez les levures et les mammifères ; ces **transcrits télomériques, nommés TERRA** (pour TElomeric Repeat containing RNA), sont impliquées dans la formation de la chromatine télomérique, dans la protection des télomères et dans la régulation négative de la télomérase [Feuerhahn *et al.*, 2010 ; Schoeftner *et al.*, 2008]. Ces transcrits télomériques interviennent également dans les interactions entre les protéines télomériques TRF1, TRF2 et leurs facteurs accessoires spécifiques [Schoeftner *et al.*, 2008].

Figure 9 : Structure des télomères humains.

(a) les extrémités chromosomiques se terminent par un ensemble de répétitions TTAGGG, de longueur variable. A la partie proximale de ces répétitions se trouve un segment de séquences répétées dégénérées et d'éléments répétés subtélomériques. La terminaison télomérique comprend une extrémité 3' simple-brin riche en G

(b) Schématisation de la t-loop : la taille de cette boucle est variable, d'après Palm et De Lange, 2008

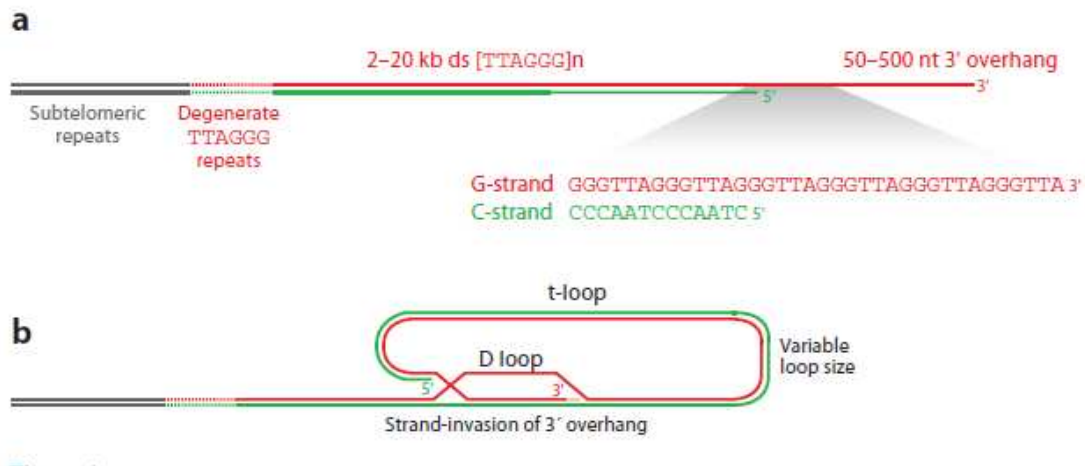
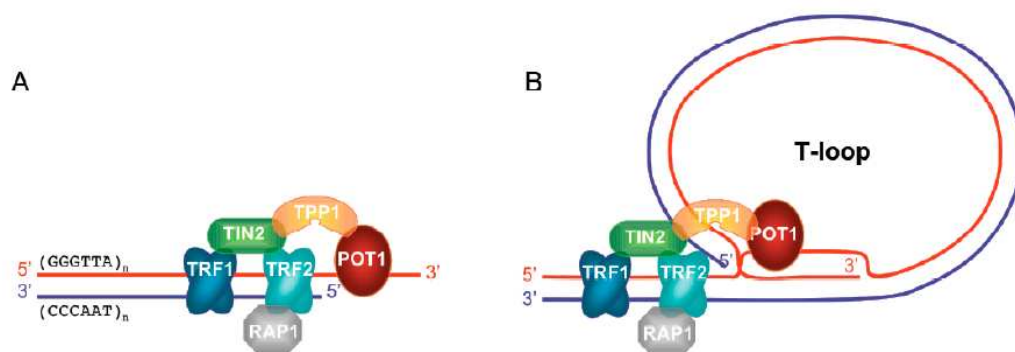


Figure 10 : Le complexe Shelterin

Deux modèles sont représentés : (A) télomère « ouvert » avec une extrémité 3' sortante liée par POT1 ; (B) télomère « fermé » replié en T-loop : POT1 se lie au brin riche en G déplacé par l'invasion de l'extrémité 3'.



4.2. Structure des télomères

Les télomères sont des **structures nucléoprotéiques** constituées de séquences répétitives d'ADN associées à de nombreuses protéines, appartenant ou non à un complexe protéique nommé télosome.

4-2-1. Séquences répétées

Chez l'homme, les séquences répétées sont constituées d'**hexamères 5'-TTAGGG-3'** double-brin, sur une longueur de 2 à 20 kb, et d'une extrémité 3' simple-brin riche en guanine, dont la taille varie de 50 à 500 nt [Palm et De Lange, 2008] (**Figure 9**). Le nombre des répétitions TTAGGG varie entre les chromosomes d'une même cellule et d'une cellule à l'autre.

La microscopie électronique a révélé que les télomères sont généralement organisés en une **structure double-brin « en lasso », nommée boucle t, ou t-loop** [Griffith *et al.*, 1999]. Cette t-loop se forme par invasion de l'extrémité libre au sein des séquences répétées double-brin. L'extrémité libre forme alors des duplexes avec l'extrémité riche en C, déplaçant l'extrémité riche en G qui forme alors la boucle D (**Figure 9**). L'élément clé de la t-loop réside dans le fait que l'extrémité libre est séquestrée dans la boucle, ce qui laisse penser que cette conformation constitue une solution architecturale au problème de protection de l'extrémité chromosomique, puisque celle-ci est rendue inaccessible à la machinerie de réparation des lésions de l'ADN et aux réactions d'élongation par la télomérase. Il faut noter que la taille de la partie circulaire de la t-loop ne semble pas influencer sur sa fonction.

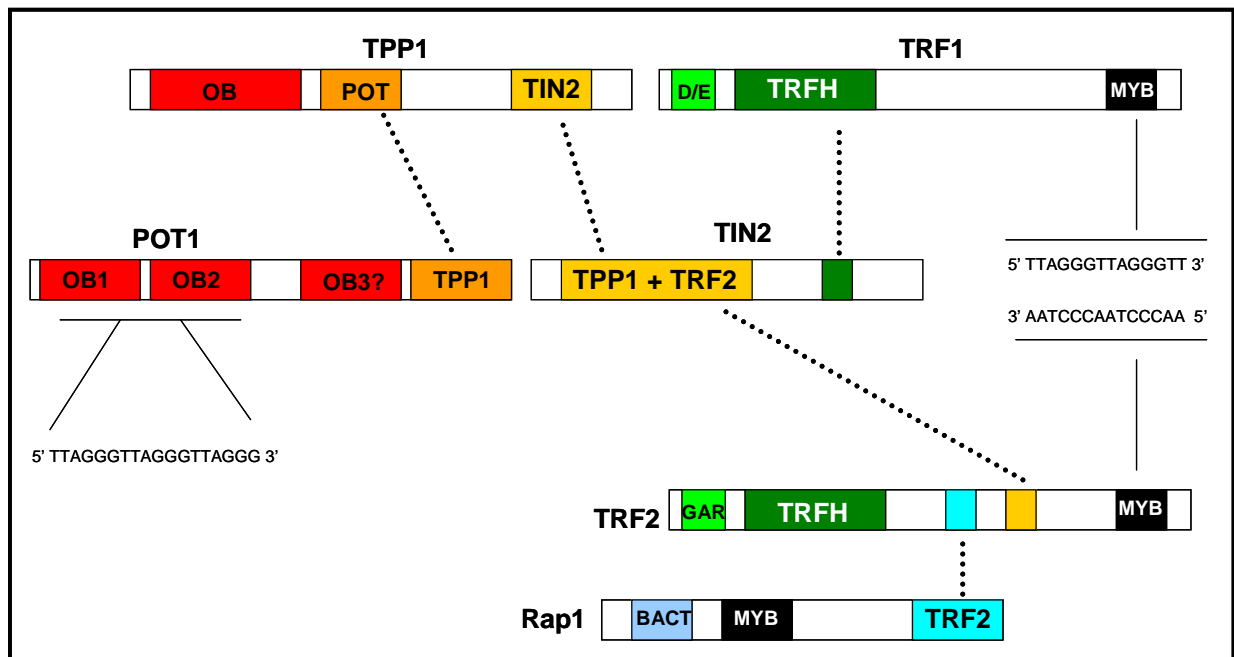
Néanmoins, à côté de cet état « fermé », il existe aussi un état « ouvert » dans lequel les protéines du télosome sont présentes et protègent le télomère (cf ci-dessous) mais laissent l'extrémité 3' accessible à la télomérase [Stansel *et al.*, 2001].

4.2.2. Complexe shelterin ou télosome

Organisation générale du complexe shelterin

Parmi les protéines télomériques, un ensemble de 6 protéines nommé **télosome ou complexe shelterin** joue un rôle majeur dans la structure et la fonction télomérique. Ce télosome regroupe les protéines POT1 (Protection Of Telomeres 1), TRF1, TRF2 (Telomeric Repeat binding Factor 1 et 2), TIN2 (TRF1-Interacting Nuclear protein 2), RAP1 (Repressor/Activator Protein 1, encore nommé TERF2IP pour telomeric repeat binding factor 2, interacting protein) et TPP1 (TIN2 and POT1 interacting Protein) (**Figure 10**).

Figure 11 : Structure et interactions des protéines du complexe shelterin, d'après Palm et De Lange, 2008



Ces protéines, spécifiquement localisées au niveau des télomères, sont présentes lors de toutes les phases du cycle cellulaire et n'ont aucune autre fonction dans le noyau [Palm et De Lange, 2008]. La spécificité du complexe shelterin pour l'ADN télomérique s'explique par la reconnaissance des répétitions TTAGGG par 3 de ses composants : TRF1, TRF2 et POT1. En effet, TRF1 et TRF2 se lient directement à l'ADN double-brin ; POT1 se lie aux séquences simple-brin de l'extrémité 3' libre et de la boucle D. TIN2 lie TRF1, TRF2 et TPP1 tandis que TPP1 lie TIN2 et POT1. RAP1 n'est lié qu'à TRF2. Ces protéines forment un complexe stable, même en l'absence d'ADN télomérique ; néanmoins, les composants du télosome sont quantitativement associés aux télomères, leur assemblage étant fonction du nombre de répétitions TTAGGG.

Structure des protéines du complexe shelterin (Figure 11)

Les protéines TRF1 et TRF2 comportent de façon très similaire un domaine d'homologie TRF (TRFH), intervenant dans leur dimérisation et le recrutement d'autres protéines, ainsi qu'un domaine C-terminal de liaison à l'ADN SANT/Myb, qui reconnaît les motifs TTAGGG double-brin ; ces 2 domaines sont reliés entre eux par un domaine charnière flexible [Palm et De Lange, 2008]. La partie N-terminale de TRF2 contient un domaine GAR (Riche en Glycine et Arginine). A contrario, TRF1 comporte des acides aminés acides à son extrémité N-terminale. Les protéines TRF1 et TRF2 forment chacune des homodimères et des oligomères hautement organisés, permettant la présence dans le complexe de multiples domaines de liaison à l'ADN et l'association à de larges séquences répétées ; cette organisation améliore l'affinité de TRF1 et TRF2 pour l'ADN télomérique et leur permet d'agir comme facteurs architecturaux, en modifiant la structure de l'ADN substrat. Malgré leur forte homologie, les domaines TRFH de TRF1 et TRF2 ne leur permettent pas de s'hétérodimériser ; de plus, ces domaines TRFH reconnaissent différentes cibles, ce qui permet à TRF1 et TRF2 de recruter des protéines accessoires spécifiques. TRF1 et TRF2 sont extrêmement abondantes, chaque télomère étant recouvert de milliers de dimères.

RAP1 est un partenaire de liaison essentiel de TRF2, mais qui demeure mal caractérisé [Li *et al.*, 2000]. RAP1 comprend 3 domaines distincts : un domaine Myb qui permet des interactions protéines-protéines avec un partenaire inconnu ; un domaine N-terminal, assurant probablement la reconnaissance de peptide phosphorylé ; un domaine C-terminal qui permet l'interaction avec une région du domaine charnière de TRF2. Cette protéine RAP1 forme un complexe avec TRF2 dont elle dépend pour sa localisation

télomérique et sa stabilité, étant donné qu'elle ne possède pas de domaine propre de liaison à l'ADN : en cas de délétion de TRF2, la grande majorité des protéines RAP1 sont également perdues [Celli *et al.*, 2005].

TIN2 occupe une place centrale dans le complexe shelterin du fait de ses liaisons avec TRF1, TRF2 et TPP1, formant ainsi un pont entre les protéines liées à l'ADN télomérique double-brin et celles liées aux séquences simple-brin [Palm et De Lange, 2008 ; Ye *et al.*, 2004]. L'interaction TRF1-TIN2 est médiée par le domaine TRFH et un motif spécifique de la région C-terminale de TIN2, tandis que la région N-terminale de TIN2 s'associe au domaine charnière de TRF2 [Chen *et al.*, 2008]. Ces interactions peuvent être simultanées, permettant à TIN2 de relier TRF1 et TRF2. TIN2 recrute également TPP1 (et par conséquent POT1) par le biais d'un troisième site d'interaction situé dans sa région N-terminale, distinct du site de liaison à TRF2. Par conséquent, une déplétion en TIN2 ou l'expression de TIN2 mutant a un effet déstabilisateur puissant sur l'ensemble du complexe shelterin [Ye *et al.*, 2004].

TPP1 connecte POT1 à TIN2 via son domaine central d'interaction avec POT1 et son domaine C-terminal de liaison à TIN2 [Palm et De Lange, 2008]. Entre ces 2 régions d'interaction protéine-protéine se trouve un domaine riche en Sérine, de fonction inconnue. A la partie C-terminale, un repli OB (oligonucleotide –or oligosaccharide- binding domain) interagit avec la télomérase, indiquant la probable implication de TPP1 dans le recrutement ou la régulation de cette enzyme [Xin *et al.*, 2007 ; Ye *et al.*, 2004].

POT1 comporte également 2 replis OB N-terminaux, qui reconnaissent le brin télomérique riche en G in vitro [Baumann *et al.*, 2001]. Les analyses de séquences suggèrent la présence d'un troisième repli OB [Theobald *et al.*, 2004]. Enfin, POT1 comporte un domaine d'interaction avec TPP1 situé dans la région C-terminale. Bien que POT1 présente une préférence pour le site TAGGGTTAG constituant la terminaison 3', le complexe POT1-TPP1 peut se lier à différentes positions le long de l'extrémité 3' simple-brin [Lei *et al.*, 2004 ; Loayza *et al.*, 2004]. Cette caractéristique permet également la liaison de POT1-TPP1 au brin riche en G de la boucle D.

Tableau 7: Fonctions des protéines du complexe Shelterin

Protéine	Fonctions principales
TRF1	Régulation négative de la longueur des télomères Régulation du fuseau mitotique
TRF2	Régulation négative de la longueur des télomères Mise en place de la t-loop
POT1	Régulation négative de l'activité de la télomérase
TPP1	Recrutement de la télomérase Régulation de l'activité de la télomérase
RAP1	Inhibition de la réparation de l'ADN télomérique
TIN2	Régulation négative de la longueur des télomères Interaction avec TRF1 participant à la formation de la t-loop

Fonctions du complexe shelterin

De façon générale, au moins 3 effets distincts de ce complexe ont été identifiés : le complexe shelterin détermine la structure de la terminaison télomérique, est impliqué dans la formation de la t-loop et contrôle la synthèse d'ADN télomérique par la télomérase [Stansel *et al.*, 2001 ; Kelleher *et al.*, 2005 ; Xin *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2005 ; Smogorzewska *et al.*, 2000].

Chaque protéine du complexe shelterin assume un (ou des) rôle(s) plus ou moins spécifique(s), qui sont résumés dans le **Tableau 7**.

Au total, la présence de ce complexe permet à la cellule de distinguer les extrémités chromosomiques naturelles des cassures de l'ADN. L'altération d'un ou plusieurs composants de ce complexe shelterin aboutit à un télomère « déprotégé » dysfonctionnel.

4.2.3. Protéines télomériques accessoires : rôle de la protéine ATM

Le complexe shelterin exerce ses fonctions grâce au recrutement transitoire de facteurs accessoires, qui n'appartiennent pas *stricto sensu* au complexe shelterin et qui sont souvent mieux connus pour leur rôle dans les voies de réparation de l'ADN [De Lange *et al.*, 2005]. Le télosome agit comme une plate-forme d'assemblage pour ces facteurs accessoires, dont les interactions moléculaires avec les sous-unités du télosome sont pour partie mal comprises à l'heure actuelle. Pour TRF1 et TRF2, ces interactions se mettent en place via un motif d'amarrage commun contenu dans le domaine TRFH [Chen *et al.*, 2008]. Les fonctions de chacun de ces facteurs accessoires sont résumées dans le **Tableau 8**.

Certains de ces facteurs accessoires sont associés à TRF1, comme la tankyrase, PINX1, la voie PIN1-FBX4 ou GNL3L. D'autre sont spécifiquement associés à TRF2, comme Apollo, le complexe MRN (formé des protéines MRE11, RAD50 et NBS1), les protéines PNUTS, MCPH1, WRN, FEN1, le complexe ORC (origin recognition complex) ou le complexe ERCC1/ERCC4. Enfin, certains facteurs accessoires impliquent TRF1 et TRF2, comme le complexe Ku ou la protéine ATM, dont la fonction peut être altérée au cours de la LLC.

La protéine ATM est une sérine kinase de 370 kd située majoritairement dans le noyau et codée par le gène *ATM* (localisé en 11q22.3 et contenant 66 exons, dont 4 non codants). Il s'agit d'un membre de la famille PIKK (Phosphoinositide 3-kinase related protein kinase family), tout comme ATR et DNA-PK. ATM est classiquement induite par la présence

Tableau 8 : Facteurs accessoires du complexe shelterin, d'après Diotti *et al.*, 2011

Facteurs associés à TRF1	Fonction télomérique
Tankyrase	PARsylation de TRF1 ; Protection ; Séparation des chromatides sœurs
PINX1	Inhibition de la télomérase
PIN1-FBX4	Régulation de la stabilité de TRF1
GNL3L	Régulation de la stabilité de TRF1
ATM	Phosphorylation de TRF1 ; régulation de la longueur des télomères
Complexe Ku	Inhibition des recombinaisons intra-télomères
Facteurs associés à TRF2	Fonction télomérique
Apollo	Traitement de l'extrémité 3' sortante ; Réplication des extrémités télomériques
Complexe MRN	Traitement de l'extrémité 3' sortante (en cas de dysfonction télomérique) ; Contrôle de la longueur des télomères
PNUTS	Régulation de la longueur des télomères
WRN/FEN1	Réplication des extrémités télomériques ; Inhibition des recombinaisons intra-télomères ; Rôle dans la voie ALT
Complexe ORC	Réplication des extrémités télomériques ; Inhibition des recombinaisons intra-télomères
XPF/ERCC1	Traitement de l'extrémité 3' sortante ; Inhibition des recombinaisons ; Contrôle de la longueur des télomères
ATM	Régulation négative par TRF2
Complexe Ku	Inhibition des recombinaisons intra-télomères
Autres	Fonction télomérique
ATR	Activation en cas de perte de POT1 ou TPP1

de cassure double-brin de l'ADN -par exemple après irradiation- et cette protéine est activée par autophosphorylation sur un résidu sérine, qui provoque la dissociation de dimères inactifs en monomères actifs [Bakkenist *et al.*, 2003].

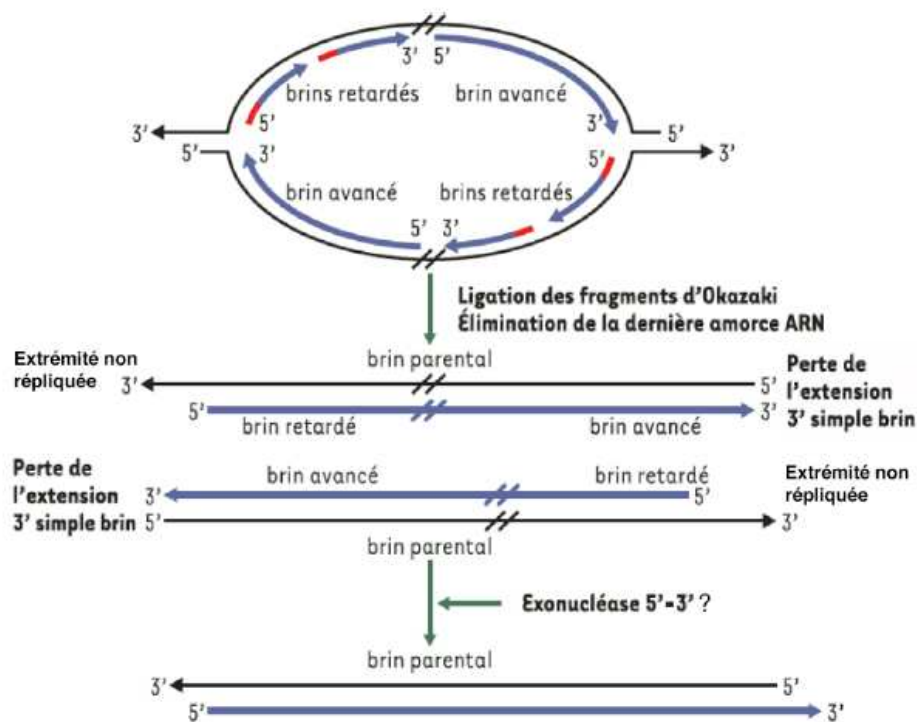
Lorsque la protéine ATM est activée, **elle intervient dans l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN**, en phosphorylant diverses protéines d'aval, comme p53, BRCA1, les kinases CHK2, RAD17, RAD9, et la protéine de réparation de l'ADN NBS1. Cette protéine ATM -et la kinase ATR qui lui est apparentée- constituent donc des **points de contrôle essentiels pour l'intégrité du génome**. Ces kinases ATM et ATR sont également capables d'induire les voies de réparation de l'ADN au niveau télomérique lorsque l'activité du complexe shelterin est altérée ou réduite, par exemple lors du raccourcissement des télomères lors de la sénescence [D'Adda di Fagagna *et al.*, 2003]. Ainsi, dans des cellules murines dont les télomères sont déprotégés, la formation de TIF (marqueurs cytologiques du dysfonctionnement télomériques) dépend d'ATM et d'ATR [Lazzerini *et al.*, 2007].

Il a été démontré que **TRF2 est impliquée dans la répression d'ATM au niveau télomérique** dans des fibroblastes de souris [Celli *et al.*, 2005]. Ce rôle de TRF2 dans le contrôle négatif de l'activation d'ATM a également été mis en évidence dans des cellules humaines [Karlseder *et al.*, 1999]. De plus, la surexpression de TRF2 induit une inhibition globale de la réponse ATM après irradiation, ce qui comprend une réduction de l'activation de p53 et de ses gènes d'aval p21, BAX et HDM2. L'interaction entre TRF2 et ATM est néanmoins indépendante de l'existence de lésions de l'ADN. L'une des kinases d'aval d'ATM, CHK2, est également complexée à TRF2 ; il est possible que TRF2 inhibe non seulement ATM, mais également la phosphorylation de sa cible CHK2 par liaison directe [Buscemi *et al.*, 2009].

Il existe également un lien entre ATM et TRF1 [Kishi *et al.*, 2001]. TRF1 présente 3 sites pouvant être reconnus par ATM : Ser²¹⁹, Ser²⁷¹ et Ser³⁶⁷. La phosphorylation d'un de ces sites (Ser²¹⁹) par ATM a été observée après irradiation. Dans cette situation, le rôle de TRF1 phosphorylé n'est pas clair à l'heure actuelle, mais il semble que ce facteur participe à une voie d'arrêt du cycle cellulaire dépendante d'ATM. L'expression d'une protéine TRF1 mutée dominante-négative entraîne un phénotype semblable à celui de la phosphorylation de

Figure 12 : Problème de réplication terminale

Ce schéma illustre le problème de la réplication terminale au niveau du brin retardé. L'élimination de la dernière amorce ARN en 5' conduit à un raccourcissement progressif des télomères au cours des divisions cellulaires et génère une extrémité 3' sortante. L'action d'une exonucléase 5'-3' pourrait expliquer la génération d'extrémité 3' sortante au niveau du brin avancé.



la Ser²¹⁹, concomitant d'un allongement des télomères, suggérant qu'ATM jouerait un rôle de régulation négative de TRF1. La phosphorylation des résidus Ser²⁷¹ et Ser³⁶⁷ s'accompagne d'une diminution de la liaison de TRF1 à l'ADN télomérique, tandis que la phosphorylation de la Ser²¹⁹ n'a pas d'effet sur cette liaison.

Au total, ATM joue un rôle complexe au niveau des télomères par le biais d'une interaction avec TRF1 et TRF2 et intervient dans la protection des télomères et dans la régulation de la longueur des télomères médiée par TRF1. **La protéine ATM interagit également avec la protéine p53** en cas de lésion de l'ADN. Les fonctions d'ATM peuvent être perturbées au cours de la LLC, par délétion du bras long du chromosome 11 emportant le gène ATM et/ou par mutation du gène ATM (*voir Données Bibliographique, Chapitre 5*).

4.3. Réplication terminale, raccourcissement des télomères et vieillissement

J. D. Watson décrit en 1970 « le problème de la réplication terminale » des chromosomes linéaires. En effet, l'ADN polymérase ne réplique pas complètement l'extrémité 5' terminale des chromosomes, entraînant de ce fait la perte d'une partie des télomères (**Figure 12**). Ce phénomène s'explique par l'utilisation d'amorces d'ARN pour l'initiation de la réplication de l'ADN dans le sens 5'-3' : la suppression de la dernière amorce sur le brin retardé génère une extrémité 3' terminale libre simple-brin. Cependant, la perte de cette dernière amorce induit la perte d'environ 10b par division au niveau de l'extrémité 3' terminale du brin fils [Stewart *et al.*, 2003]. Or la perte de matériel chromosomique par division est plus importante, entre 50 et 150 pb, indiquant que les extrémités chromosomiques sont activement dégradées. A l'heure actuelle, les mécanismes de formation de l'extrémité 3' simple-brin libre ne sont pas parfaitement connus, notamment au niveau du brin avancé, mais la résection de l'extrémité complémentaire riche en C est globalement admise [Makarov *et al.*, 1997] ; différentes molécules semblent intervenir dans cette résection, notamment l'exonucléase 5'-3' Apollo et le complexe MRN. Le rôle de la télomérase a été formellement exclu [Hemann *et al.*, 1999].

De nombreuses études ont démontré que la longueur des télomères présents dans les lymphocytes humains se raccourcit progressivement en fonction de l'âge des individus analysés [Weng *et al.*, 1998]. Les télomères les plus courts sont retrouvés chez les octogénaires

Figure 13 : Dynamique de la longueur des télomères dans les cellules humaines, dépendante de la télomérase, d'après Zimmerman et Martins, 2008

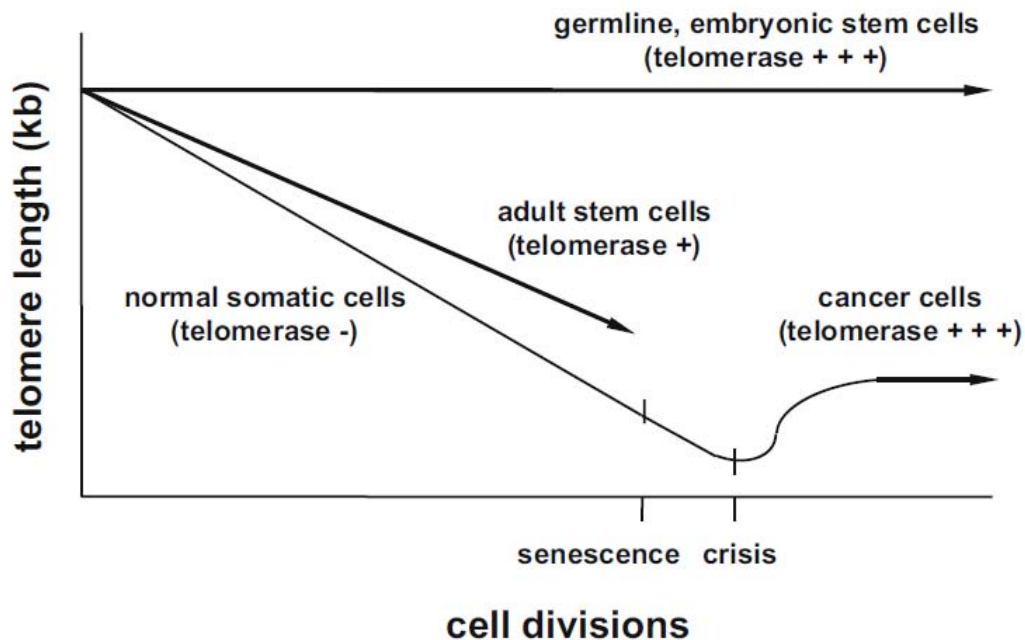
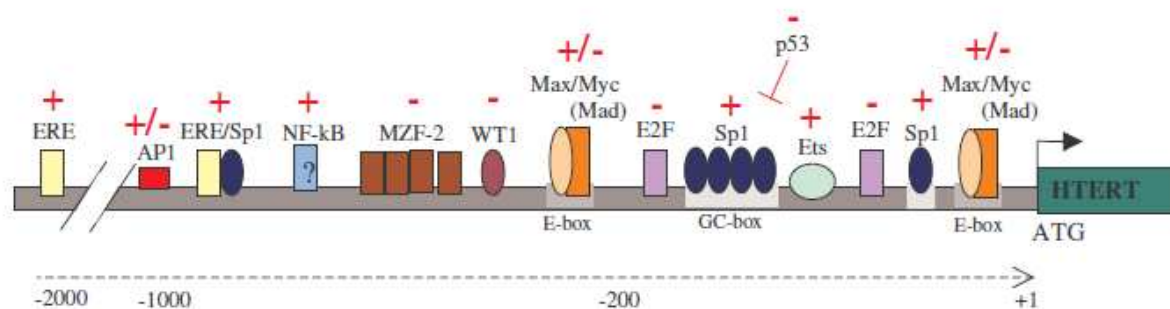


Figure 14 : Régulation transcriptionnelle du gène *hTERT* : fixation des différents facteurs de transcription sur le promoteur du gène *hTERT*

ERE : Estrogen responsive element, Sp1 : Stimulating protein 1, MZF-2 : Myeloid zinc finger 2, WT1 : Wilms tumor 1, Ets : E twenty six specific ; + : activateur de la transcription, - : répresseur de la transcription



(4000 à 6000 pb), tandis que, chez les nouveau-nés, la longueur des télomères oscille entre 8000 à 12000 pb.

4.4. Télomérase et régulation de la longueur des télomères

La télomérase maintient la longueur des télomères, ou les allonge dans certains cas, en ajoutant des répétitions TTAGGG à l'extrémité 3' des chromosomes [Bodnar *et al.*, 1998].

Cette enzyme est une ribonucléoprotéine constituée de 2 composants majeurs indissociables de son activité. Le premier est la sous-unité catalytique, c'est-à-dire une transcriptase inverse hautement conservée nommée **hTERT** (Telomerase Reverse Transcriptase). Le second est une matrice ARN nommée **hTERC** (Telomerase RNA Component) dont une partie de la séquence est complémentaire à TTAGGG et sert de matrice pour la synthèse de novo de séquences télomériques.

Si la plupart des cellules somatiques humaines expriment constitutivement la matrice ARN, hTERC, ce n'est pas le cas de la sous-unité catalytique hTERT qui s'exprime uniquement dans les cellules à haute activité proliférative, comme les cellules germinales et les cellules souches [revue par Bryan & Cech, 1999]. Par conséquent, l'activité de la télomérase est physiologiquement nulle dans la très grande majorité des cellules somatiques, qui subissent l'érosion progressive de leurs télomères à chaque division cellulaire du fait du problème de réplication terminale. Néanmoins, même dans les cellules souches exprimant la télomérase, la taille des télomères diminuent avec l'âge (**Figure 13**).

L'expression de *hTERT* est fortement régulée d'une cellule à l'autre. Il a d'ailleurs été démontré que l'expression de *hTERT* constitue le facteur limitant de l'activité télomérase et que son expression ectopique permettait de rétablir une activité télomérase dans des cellules qui en étaient dépourvues [Kirkpatrick *et al.*, 2003].

La régulation transcriptionnelle de *hTERT* est complexe et fait appel à de multiples facteurs de transcription (**Figure 14**). Des phénomènes épigénétiques pourraient également en partie expliquer la différence d'expression de la télomérase entre les cellules normales et les cellules cancéreuses [Wang & Zhu, 2003].

Figure 15 : Organisation du gène *hTERT* avec les exons (en noir) et les sites d'épissage alternatif (insertions 1 à 4 et délétions alpha et beta)

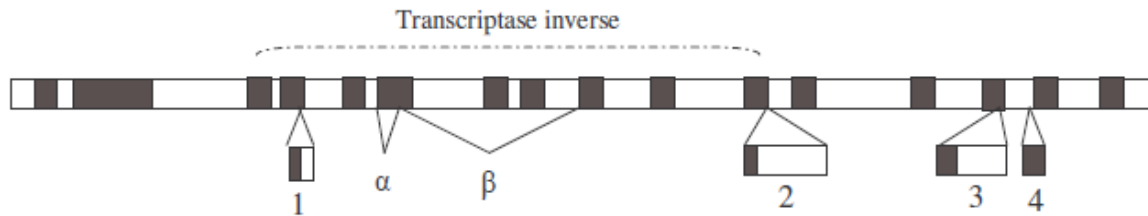
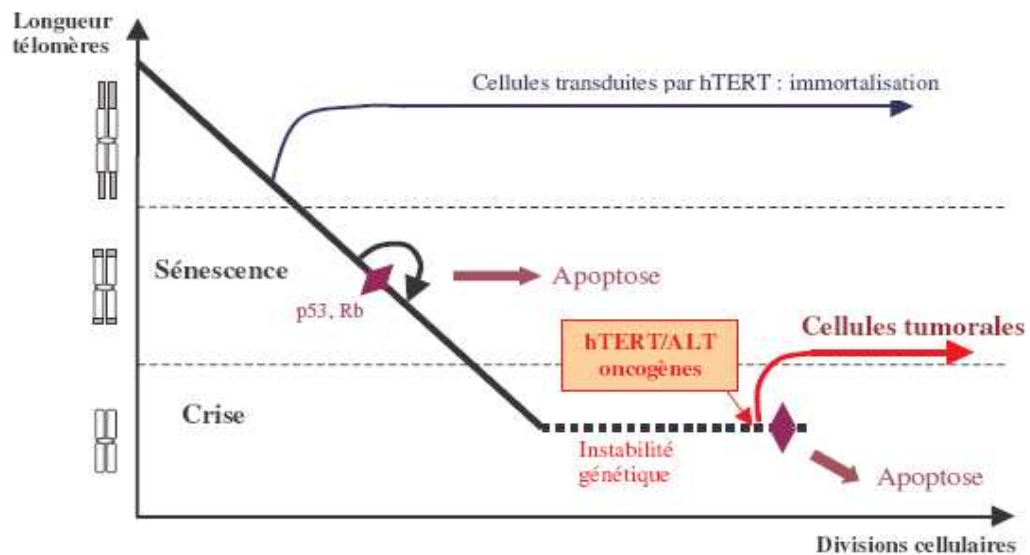


Figure 16 : Hypothèse télomérique du cancer : implication des télomères et de la télomérase dans la tumorigénèse, d'après Zimmermann et Martens, 2008



Sur un plan post-transcriptionnel, l'expression de *hTERT* peut être régulée par un épissage alternatif de son ARN messenger [Ulaner *et al.*, 1998]. Il existe en effet plusieurs variants d'épissage résultant de quatre insertions possibles de séquences introniques et de deux délétions (**Figure 15**). Seul le transcrit entier, sans les délétions ni les insertions, donne lieu à une protéine hTERT active.

Enfin, des étapes de **régulation post-traductionnelle** sont décrites : l'activité de la télomérase dépend en effet de l'assemblage des différentes sous-unités, de la translocation au noyau -où s'exerce son activité catalytique- et de phénomènes de phosphorylation.

Le **complexe shelterin** intervient également dans la régulation en cis de l'action de la télomérase. Cette régulation se fonde sur un modèle de « comptage des protéines », dans lequel de grandes quantités de complexes shelterin inhibent fortement la télomérase, possiblement par l'occupation de l'extrémité libre 3' simple-brin par POT1, ou par le biais de modification post-traductionnelles de POT1 ou d'un facteur accessoire [Diotti *et al.*, 2011]. Une diminution de l'expression de TRF1 et TRF2, induite par l'introduction d'allèles dominant-négatifs, entraîne une élongation des télomères par la télomérase, confirmant le rôle du télosome dans la régulation négative de la télomérase. Néanmoins, la dualité et la complexité de la fonction du télosome sont illustrées par le rôle apparemment contradictoire de recrutement de la télomérase par TPP1.

4.5. Télomères et instabilité génomique : hypothèse télomérique du cancer

Au fur et à mesure des divisions cellulaires, la taille des télomères diminue dans les cellules somatiques jusqu'à atteindre une taille minimale critique (**Figure 16**). Lorsque cette taille critique est atteinte, le nombre de complexes shelterin devient insuffisant pour protéger l'extrémité chromosomique, ce qui déclenche un signal de lésion de l'ADN provoquant un arrêt irréversible de la croissance cellulaire nommée sénescence [Blackburn *et al.*, 2001]. De cette façon, les télomères agissent comme une « horloge » qui détermine la durée de vie de la cellule. De nombreux travaux ont évalué le nombre minimal de répétitions télomériques requises pour la protection efficace de l'extrémité chromosomique. Les premières expériences de transfection ont montré que 500 pb suffisent à la formation d'un télomère totalement fonctionnel [Farr *et al.*, 1991], puis les expériences d'inhibition de la télomérase ont indiqué que la réduction de la taille du télomère à moins d'1 kb est nécessaire pour induire la sénescence dans des lignées de cellules tumorales [Damm *et al.*, 2001].

Ce signal de lésion de l'ADN, lié au raccourcissement extrême des télomères, est médié par des voies de signalisation impliquant les protéines p53 et RB, qui régulent la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN et provoque l'apoptose des cellules altérées. Cependant, par inactivation de p53 et/ou RB, certaines cellules peuvent échapper à ce point de contrôle et poursuivre les divisions cellulaires, ce qui s'accompagne d'une poursuite de l'érosion télomérique [Shay *et al.*, 1991]. Cette érosion s'accompagne de la perte de la fonction de protection, entraînant une instabilité génomique, c'est-à-dire l'apparition d'anomalies chromosomiques, comme par exemple des fusions des extrémités chromosomiques entre elles. On parle à ce stade de « crise », qui s'accompagne d'une mort cellulaire massive.

Néanmoins, certaines cellules en crise vont échapper à la mort cellulaire par réactivation de l'expression de la télomérase, ce qui leur permet de maintenir la taille des télomères et d'atteindre une forme d'immortalisation [Bodnar *et al.*, 1998]. Ainsi, 90% des tumeurs humaines expriment la télomérase ; cette expression constitue l'une des voies moléculaires requises pour la transformation maligne des cellules et contribue à la perte de contrôle de la croissance cellulaire observée dans de nombreux cancers [Kim *et al.*, 1994].

4.6. Télomères et LLC

4.6.1. Valeur pronostique du couple télomères-télomérase

Plusieurs études ont mis en évidence une **activité de la télomérase dans des cellules de LLC** en utilisant la technique de TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) [Bechter *et al.*, 1998 ; Trentin *et al.*, 1999 ; Damle *et al.*, 2004 ; Verstovsek *et al.*, 2004]. L'étude de Trentin *et al* [1999], portant sur une cohorte réduite (15 patients), montrait que l'activité télomérasique était plus élevée chez les patients évolutifs que chez les patients porteurs d'une maladie stable. Dans le travail de Bechter *et al.* [1998], une forte activité télomérasique semblait être prédictive d'une évolution défavorable avec une survie raccourcie. Cependant, ce résultat n'était pas confirmé par l'étude de Damle *et al.* [2004], qui rapportait une activité télomérasique plus élevée parmi les patients de pronostic défavorable non mutés pour les IgV_H que parmi les patients mutés, sans pour autant mettre en évidence de lien entre activité télomérasique et survie. Enfin, pour Verstovsek *et al.* [2004], l'activité télomérase ne pouvait être considérée comme un marqueur du pronostic de la LLC, car aucun lien n'était mis en évidence dans cette étude entre l'activité télomérase et le stade de la

maladie, l'existence de traitement antérieur ou la survie ; cependant, 41% des échantillons seulement présentaient une activité télomérase détectable dans cette série.

Par la suite, **l'expression de *hTERT*** (étudiée cette fois par qRT-PCR) a été mise en évidence chez 59% des patients dans une série de 90 patients [Tchirkov *et al.*, 2004]. Dans cette cohorte, les patients exprimant *hTERT* présentaient une survie significativement raccourcie par rapport aux patients n'exprimant pas *hTERT*, quelque soit le stade de la maladie. D'autre part, le niveau d'expression de *hTERT* était significativement plus élevé chez les patients non mutés que chez les patients mutés pour les IgV_H. La valeur pronostique de ce marqueur moléculaire a ensuite été confirmée par l'étude de Terrin *et al.* [2007] menée sur 134 patients, qui montrait une différence de survie entre les patients exprimant faiblement ou fortement *hTERT*. De façon intéressante, les patients non mutés exprimant faiblement *hTERT* présentaient une survie globale proche de celle des patients mutés exprimant fortement *hTERT* ; la combinaison de ces 2 marqueurs permettraient donc s'identifier des sous-groupes de patients ayant une évolution distincte.

La longueur des télomères constitue également un facteur pronostique reconnu au cours de la LLC [Bechter *et al.*, 1998 ; Grabowski P *et al.*, 2005 ; Ricca *et al.*, 2007 ; Roos *et al.*, 2008 ; Rossi *et al.*, 2009 ; Lin *et al.*, 2010 ; Sellman *et al.*, 2011]. Les télomères courts sont en particulier associés à un raccourcissement de la survie globale et de la survie sans événement. Il existe par ailleurs une corrélation entre absence de mutation des gènes IgV_H et télomères courts ; cette relation pourrait refléter la longueur initiale des télomères de la cellule originelle, conséquence du passage ou non à travers le centre germinatif.

Enfin, il existe une corrélation inverse entre la longueur des télomères et le niveau de l'expression de *hTERT* [Rampazzo *et al.*, 2012 ; Damle *et al.*, 2004], indiquant que **l'activation de la télomérase est la conséquence du raccourcissement des télomères.**

4.6.2. Dysfonction télomérique et instabilité génomique

La longueur des télomères est corrélée à la nature et à la complexité des anomalies génomiques, les télomères courts étant particulièrement associés à la survenue d'anomalies cytogénétiques défavorables [del(17p), del(11q), anomalies multiples], alors que les télomères longs sont associés aux anomalies cytogénétiques favorables [del(13q) isolée ou

caryotype normal] [Roos *et al.*, 2008 ; Rampazzo *et al.*, 2012]. Ceci suggère que les télomères raccourcissent jusqu'à atteindre une taille critique, à partir de laquelle ils deviennent dysfonctionnels, ce qui se traduit par la survenue d'anomalies génomiques. Dans ce sens, le travail de Brugat *et al.* [2010], mené dans des cellules de LLC résistantes à l'apoptose, montre que ces cellules ont des télomères plus courts que les cellules sensibles à l'apoptose, forment des TIF et présentent une augmentation des quantités télomériques de protéines intervenant dans la réparation de l'ADN (de type NHEJ). Ces cellules présentent également des délétions télomériques, sur une chromatide ou les deux. Ces altérations télomériques sont concomitantes de la présence de multiples aberrations chromosomiques et de caryotype complexes, traduisant l'instabilité génomique [Brugat *et al.*, 2010].

Chez les patients présentant des télomères très courts, les analyses de CGH-array (hybridation génomique comparative sur puce à ADN) ont également mis en évidence des **réarrangements génomiques de grande taille, concentrés dans les régions télomériques** ; ces anomalies ne sont pas retrouvées chez les patients ayant des télomères longs [Lin *et al.*, 2010]. Dans cette étude menée chez 41 patients, la fréquence des télomères courts et des événements de fusion augmente avec l'évolution de la maladie, indiquant que l'érosion télomérique est critique pour la progression de la LLC. Cependant, de telles dysfonctions télomériques sont également observées dans une partie des patients en stade précoce, suggérant que ces altérations télomériques peuvent précéder la progression de la maladie. Ceci a été récemment confirmé par l'étude de Augereau *et al.* [2013], menée sur 23 patients en stade A au diagnostic, qui montre une augmentation significative du recrutement de facteurs de réparation de l'ADN au niveau télomérique par rapport à des sujets sains, sans raccourcissement notable des télomères. Il s'y associe une diminution de l'expression de TPP1 et TIN2. La déprotection télomérique mimant des lésions de l'ADN ne semble donc pas uniquement liée au raccourcissement de l'extrémité télomérique, mais également à une altération du complexe shelterin, pouvant survenir précocement dans l'évolution de la maladie.

Des **modifications d'expression de gènes du complexe shelterin** ont d'ailleurs été mises en évidence au cours de la LLC, comme une diminution de l'expression de *TRF1*, *RAP1* et *POT1*, ou une augmentation de l'expression de *TPP1* [Poncet *et al.*, 2008]. Des modifications d'expression d'autres gènes codant des protéines multifonctionnelles intervenant au niveau des télomères ont également été rapportées dans cette étude, avec une

diminution de l'expression de la *dyskérine*, de *hTERT*, de *RAD50* et *KU80*, et une augmentation de l'expression de *RPA1*. Ces profils d'expression suggèrent l'existence d'une dysfonction télomérique globale au cours de la LLC.

Au total, diverses études ont démontré dans la LLC l'impact clinique du raccourcissement télomérique et l'existence d'une association entre télomères courts et nature des anomalies génomiques. D'autres travaux ont suggéré l'existence d'altérations du complexe shelterin, mais la relation entre cette dysfonction et la longueur de télomères, l'activité de la télomérase ou l'existence d'anomalies génomiques n'a pas encore été explorée.

L'un des objectifs de notre travail est d'étudier de façon globale et descriptive la relation entre la présence d'une dysfonction télomérique -évaluée par l'étude combinée de la longueur des télomères, de l'expression de *hTERT*, de l'expression des gènes du complexe shelterin- et l'existence d'anomalies cytogénétiques, reflet de l'instabilité génomique.

Tableau 8 : Principales anomalies chromosomiques récurrentes au cours de la LLC

Anomalie	Fréquence	Valeur pronostique	Locus critique	Gène impliqué
Caryotype et/ou FISH				
del(13q)	55-60%	Favorable	13q14.3	<i>miR-15a</i> <i>miR-16-1</i>
+12	13-15%	Intermédiaire	12q13-q15	-
del(11q)	18%	Défavorable	11q22	<i>ATM</i>
del(17p)	7%	Défavorable	17p13.1	<i>P53</i>
del(6q)	4,5 à 6%	Défavorable	6q21	-
Translocations Ig	2,2%	Favorable	18q21	<i>BCL2</i>
	0,6%	Défavorable	19q13	<i>BCL3</i>
	Très rare	-	7q21	<i>CDK6</i>
	Très rare	-	2p13-p16	<i>BCL11A</i>
		Défavorable	8q24	<i>MYC</i>
Complexes	16%	Défavorable	-	-
CGH array				
+19	4,7% (1,7% par caryotype)	Non déterminée	-	-
dup(2p)	4,7%	Défavorable	-	<i>MYCN</i> <i>REL</i>
	28% des stades B/C			
dup(8q)	3,7%	Défavorable	8q24	<i>C-MYC</i>
dup(3q)	5,6%	-	3q26	<i>PIK3CA</i>
dup(20q)	19%	-	20q13.12	-

5. ANOMALIES GENOMIQUES DE LA LLC

5.1. Cytogénétique conventionnelle et moléculaire

5.1.1. Données générales

En 1990, Juliusson *et al.* fut le premier à démontrer que les aberrations chromosomiques mises en évidence par le caryotype présentent une valeur pronostique indépendante dans la LLC ; cependant, à l'époque, le faible index mitotique *in vitro* des lymphocytes B pathologiques ne permettait de détecter des anomalies clonales que dans 40 à 50% des cas. Le développement de la FISH interphasique, qui s'affranchit de l'obtention d'une division cellulaire *in vitro*, a permis de contourner cette limite ; ainsi Döhner *et al.* a démontré en 2000 que la FISH peut détecter des déséquilibres chromosomiques dans 82% des LLC. Plus récemment, l'utilisation d'agents mitogènes spécifiques des lymphocytes B (Interleukine-2 et Oligonucléotides CpG) a permis d'obtenir un caryotype analysable dans plus de 90% des cas, et des anomalies clonales dans 53% à 83% des cas selon les séries. [Haferlach *et al.*, 2007 ; Put *et al.*, 2009; Struski *et al.*, 2009]. En pratique, ces 2 approches sont actuellement combinées en routine pour mettre en évidence les anomalies récurrentes classiques, principalement recherchées par FISH, ainsi que les déséquilibres plus rarement décrits et les remaniements complexes révélés par le caryotype. La technique d'hybridation génomique comparative sur puce à ADN peut compléter de façon intéressante cette approche ; elle a en particulier permis de préciser la nature de certains déséquilibres et de mettre en évidence de nouvelles anomalies récurrentes.

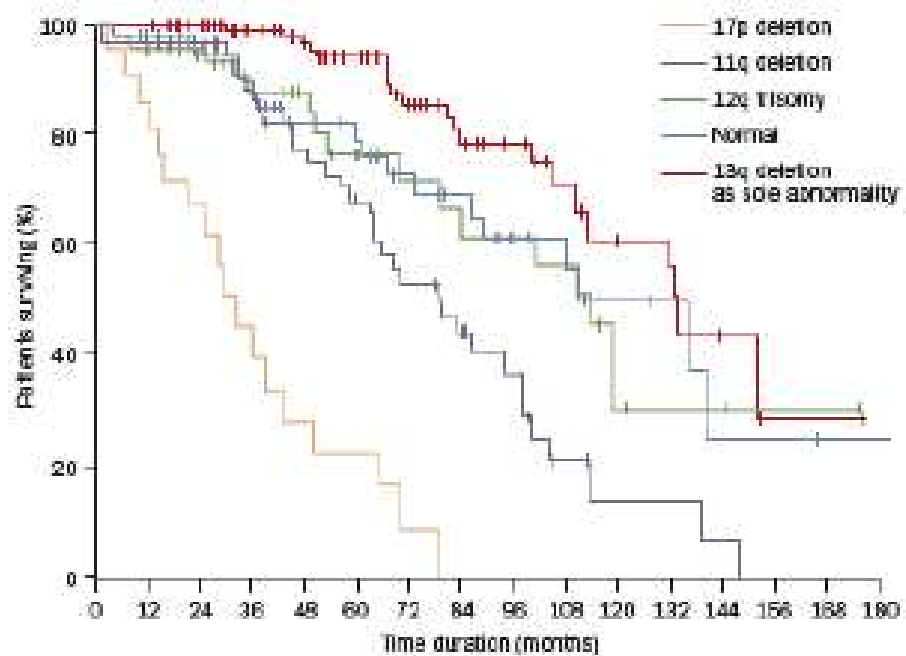
5.1.2. Principales anomalies récurrentes

Les 4 anomalies les plus fréquemment observées sont la délétion 13q, la délétion 11q, la trisomie 12 et la délétion 17p (**Tableau 8**). Ces anomalies peuvent être mises en évidence au diagnostic ou apparaître au cours de l'évolution de la pathologie.

Délétion 13q

La **délétion 13q** est mise en évidence par FISH chez 55 à 60% des patients, de façon mono-allélique ou bi-allélique. Cette anomalie est considérée comme favorable lorsqu'elle est

Figure 17 : Impact des anomalies cytogénétiques sur la survie, d'après Döhner *et al.*, 2000



isolée, avec une survie sans traitement et une survie globale de 92 et 133 mois dans la cohorte historique de Döhner (contre 49 et 111 mois en cas de FISH normale, **Figure 17**) [Döhner *et al.*, 2000].

La région minimale de délétion est située en 13q14.3 et contient les séquences codant pour deux microARN, **miR15a** et **miR-16-1**, au sein de l'intron 4 du gène LEU2. Ces microARN sont connus pour leur rôle suppresseur de tumeur, du fait d'une induction de l'apoptose et d'une inhibition de la prolifération et de l'invasion [Cimmino *et al.*, 2005]. L'expression de miR-15a et miR-16-1, déterminée par Northern Blot et microarray, est fréquemment diminuée au cours de la LLC comparativement à un tissu sain, ce qui semble indiquer que ces micro-ARN joueraient un rôle dans l'homéostasie cellulaire, rôle qui serait perdu lors de la leucémogénèse. Récemment, l'étude du niveau d'expression de miR-15a par RT-PCR quantitative a démontré l'existence d'un gradient d'expression entre les patients normaux, les patients porteurs d'une délétion mono-allélique et les patients porteurs d'une délétion bi-allélique [Smonskey *et al.*, 2012]. Néanmoins, la délétion 13q est paradoxalement associée à une survie plus prolongée, sans différence de pronostic entre les délétions bi et mono-alléliques [Garg *et al.*, 2011]. D'autre part, la délétion 13q n'est pas le seul mécanisme à l'origine de la diminution de niveau d'expression de miR-15a et miR-16-1 : en effet, une mutation ponctuelle, en aval de miR-16-1, a été décrite comme responsable d'une down-régulation en l'absence d'aberrations chromosomiques [Raveche *et al.*, 2007]. Des phénomènes épigénétiques ou des défauts de synthèse des micro-ARN peuvent également être mis en cause. Enfin, étant donné que p53 régule la transcription de miR-15a et miR-16-1, l'inactivation de l'activité transcriptionnelle de p53 peut provoquer une diminution d'expression des microARN en l'absence de délétion 13q.

Plus récemment, les analyses de SNP-array ont permis de mieux définir l'anatomie de ces délétions 13q [Ouillet *et al.*, 2011] : 2 sous-groupes de délétions 13q ont été individualisés, constitués des délétions de type I (~30% de l'ensemble des patients) excluant le gène *RBI* (13q14.2) et des délétions de type II (~20% de l'ensemble des patients) incluant le gène *RBI*. Les délétions de type II sont associées à un raccourcissement de la survie, et surtout à une complexité génomique marquée, suggérant que ces délétions 13q de grande taille pourraient contribuer à la désorganisation du génome et à la progression de la maladie. La recherche de la délétion *RBI* pourrait donc avoir un intérêt clinique, surtout en cas de délétion 13q isolée. Dans cette étude, le niveau d'expression de miR-15a et miR-16-1 n'est pas corrélée à la présence d'une délétion ne présente pas de valeur pronostique significative.

Trisomie 12

La **trisomie 12**, observée chez 15% à 20% des patients, est associée à un pronostic intermédiaire, avec une survie sans traitement et une survie globale de 33 et 114 mois respectivement [Döhner *et al.*, 2000]. Cette anomalie est particulièrement observée au cours des LLC atypiques sur un plan cytologique et immunophénotypique. Cette trisomie 12 est le plus souvent totale, parfois partielle ; l'étude des cas de trisomie 12 partielle par FISH a permis de restreindre la « région minimale de duplication » au segment 12q13q22 [Dierlamm *et al.*, 1997]. Cette région contient un grand nombre de gènes candidats pouvant expliquer les particularités phénotypiques (*MDM2*, *CDK2*, *CDK4*, *GLI1*, *HMGA2*...). Néanmoins, les phénomènes physiopathologiques associés à cette anomalie restent mal connus à l'heure actuelle.

Délétion 11q

La **délétion 11q** (10 à 18%), est associée aux formes tumorales de LLC et à un pronostic défavorable (survie sans traitement et survie globale de 13 et 79 mois respectivement) [Döhner *et al.*, 1997 ; Döhner *et al.*, 2000]. Cette anomalie est surtout prédictive d'une mauvaise réponse aux chimiothérapies générant des dommages à ADN ; cette chimiorésistance est cependant amendée par l'ajout d'anticorps anti-CD20. La délétion 11q est plus fréquente chez les sujets jeunes, et son impact péjoratif sur la survie est plus marqué avant 55 ans.

Sur le plan moléculaire, le gène candidat semble être le **gène *ATM*** (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) intervenant dans la réparation des lésions double-brin de l'ADN. Il se situe en effet dans la région minimale de délétion identifiée en 11q22.3q23.1, initialement évaluée à 2 à 3 Mb et récemment restreinte à 416 kb [Rose-Zerilli *et al.*, ASH 2012]. De plus, les patients atteints d'Ataxie-Télangiectasie montrent une prédisposition particulière à développer des tumeurs lymphoïdes B ou T. Cependant, une expression absente ou diminuée d'*ATM* n'a été mise en évidence que chez seulement 40% des patients porteurs d'inactivation bi-allélique d'*ATM* [Stankovic *et al.*, 1999], et d'autres études n'ont retrouvé qu'un taux modeste de mutations de l'allèle *ATM* restant dans des LLC 11q-, suggérant l'existence d'autres gènes cibles que *ATM*, comme par exemple *RDX* (Radixine), *FDX1* (Ferredoxine 1), ou encore *NPAT*, *CUL5* et *PPP2R1B* [Schaffner *et al.*, 1999 ; Stilgenbauer *et al.*, 1996 ; Kalla *et al.*, 2007]. Récemment, le travail de Ouillet *et al.* [2010] a démontré que les délétions 11q sont également responsables de perte mono-allélique de *MRE11A* et *H2AFX*, deux gènes eux-

aussi impliqués dans la réparation des lésions de l'ADN double-brin. Ces résultats suggèrent l'existence d'une altération complexe des phénomènes de réparation de l'ADN dans les LLC 11q- pouvant expliquer le lien fréquemment observé entre délétion 11q et anomalies génomiques multiples [Haferlach *et al.*, 2007].

Délétion 17p

La **délétion 17p** représente 7% à 10% des patients non traités [Döhner *et al.*, 2000 ; Dicker *et al.*, 2009] ; l'incidence de la délétion 17p est plus élevée à la rechute et au cours des LLC réfractaires à la chimiothérapie (jusqu'à 50% des patients). Elle est responsable de la perte de la région 17p13.1, site du gène suppresseur de tumeur *TP53*.

Sur le plan cytogénétique, au moins deux translocations déséquilibrées récurrentes ont été décrites à l'origine de cette délétion : il s'agit de translocations dicentriques, dic(4;17)(p11;p11) et dic(17;18)(p11;p11) [Döhner *et al.*, 1995 ; Callet-Bauchu *et al.*, 1996].

La délétion 17p est associée à un **pronostic très défavorable**, avec une survie sans traitement et une survie globale respectivement de 9 et 32 mois dans l'étude de Döhner ; par la suite, de nombreux essais prospectifs et études monocentriques ont confirmé la valeur pronostique majeure des délétions 17p [Oscier *et al.*, 2002 ; Zenz *et al.* 2008 ; Hallek *et al.*, 2010 ; Grever *et al.*, 2007 ; Tam *et al.*, 2009 ; Wierda *et al.*, 2011 ; Fischer *et al.*, 2011 ; Doubek *et al.*, 2011 ; Bullian *et al.*, 2012]. Il s'agit à l'heure actuelle du **facteur pronostique le plus puissant**, avant le stade et l'âge, avant le statut IgV_H, celui qui s'accompagne des survies globales les plus courtes.

Cet impact péjoratif s'explique en partie par la **non-réponse au traitement** contenant de la fludarabine ou des alkylants ; en effet, ces traitements agissent sur les cellules leucémiques par la mise en jeu de l'apoptose p53-dépendante qui est altérée en cas de délétion 17p. Les traitements alternatifs comme l'alemtuzumab et l'allogreffe restent efficaces, ainsi que les agents cytotoxiques agissant de façon indépendante de p53 [Lozanski *et al.*, 2004].

Par ailleurs, la présence de cette anomalie est associée à un risque plus important de **reprise évolutive** après traitement et à un risque accru de **syndrome de Richter**.

Il existe également une relation entre délétion 17p et **complexité des anomalies chromosomiques** qui participent vraisemblablement à l'agressivité de la pathologie [Haferlach *et al.*, 2007]. Les travaux de Zenz *et al.* [2008] ont confirmé que le nombre de gains ou de pertes chromosomiques était significativement augmenté en cas de délétion 17p

(3,75 versus 1,65). Une étude récente a démontré que le pronostic des patients ayant une délétion 17p est modulé par le taux allélique de la délétion et par la complexité des anomalies génomiques associées [Delgado *et al.*, ASH 2012]. La présence d'au moins 3 déséquilibres est particulièrement prédictive de la survie sans traitement chez les patients porteurs d'une délétion 17p *de novo* et précédemment non traités.

5.1.3. Autres anomalies chromosomiques

Anomalies déséquilibrées

Bien que moins fréquentes, **d'autres anomalies récurrentes déséquilibrées** ont été rapportées, notamment grâce à l'utilisation de l'hybridation génomique comparative sur puce à ADN (**Tableau 8**). On retient la délétion 6q (4,5% à 6%), la trisomie 19 (1,7% à 4,7%), les gains des régions 2p, 8q24, 3q26 et 20q13, la délétion 14q, ces déséquilibres étant pour la plupart considérés comme défavorables [Juliussen *et al.*, 1990 ; Schwaenen *et al.*, 2004 ; Sellmann *et al.*, 2007 ; Coll-Mulet Gil *et al.*, 2009 ; Chapiro *et al.*, 2010 ; Rinaldi *et al.*, 2011 ; Brown *et al.*, 2012 ; Rodriguez *et al.*, 2012 ; Mian *et al.*, 2013].

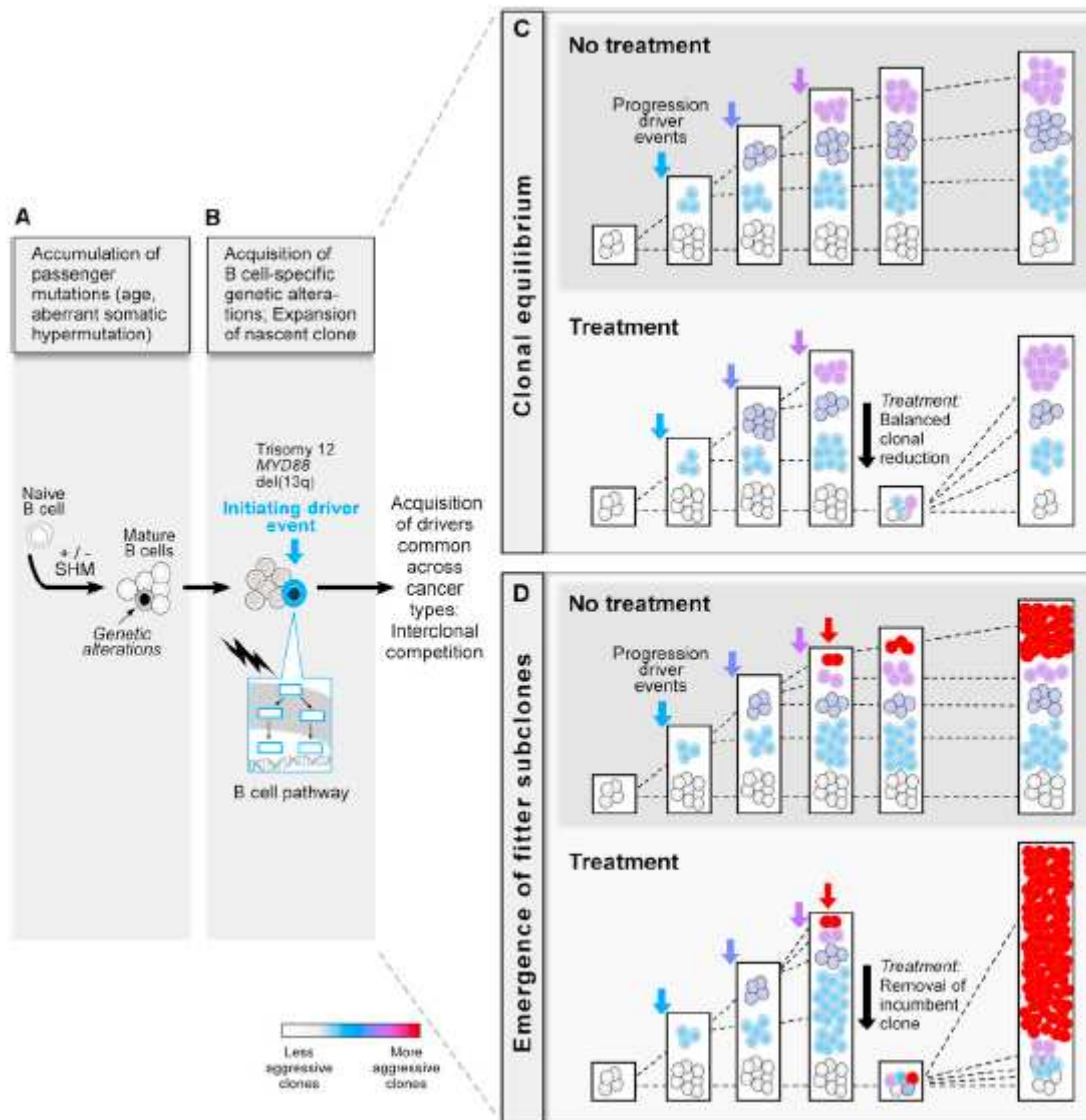
Translocations réciproques

Bien que les délétions et amplifications soient les anomalies les plus fréquentes, les **translocations réciproques**, équilibrées ou non, ne sont pas rares, puisqu'elles représentent 20% à 34% des patients selon les séries [Mayr *et al.*, 2006 ; Haferlach *et al.*, 2007 ; Put *et al.*, 2009]. Elles peuvent parfois impliquer les gènes des immunoglobulines *IGH*, *IGK* ou *IGL*, (5 à 7%), leurs partenaires les plus fréquents étant *BCL2*, *BCL3*, *BCL11A* et *CDK6* (**Tableau 8**). Hormis la rare translocation 14;18 *IGH-BCL2* qui est associée à une évolution favorable (2% des LLC), la présence de translocations chromosomiques -impliquant ou non les gènes des immunoglobulines- est un facteur de pronostic péjoratif [Mayr *et al.*, 2006 ; Cavazzini *et al.*, 2008 ; Put *et al.*, 2009 ; Nguyen-Khac *et al.*, 2011]. La translocation 14;19 *IGH-BCL3* et les translocations impliquant *MYC* (8q24) sont associées à un pronostic particulièrement défavorable [Put *et al.*, 2012].

Caryotypes complexes et évolutions clonales

Enfin, la présence de **caryotypes complexes** (≥ 3 anomalies) et/ou d'**évolution clonale** constituent des marqueurs péjoratifs [Mayr *et al.*, 2006 ; Haferlach *et al.*, 2007 ;

Figure 18 : Modélisation des étapes de transformation au cours de la LLC, d'après Landau *et al.*, 2013

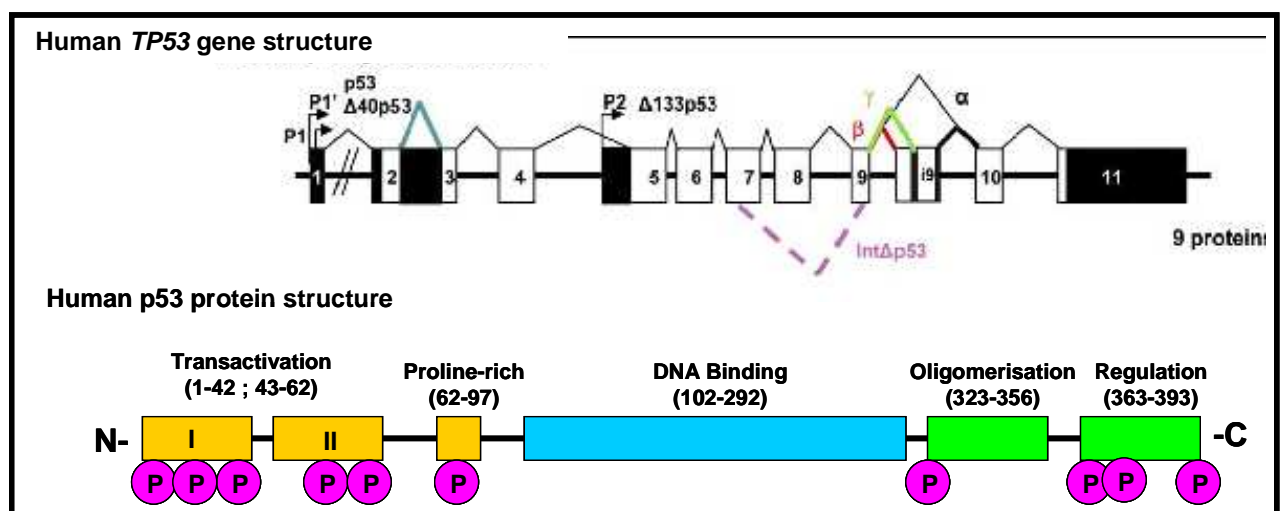


Stilgenbauer *et al.*, 2007 ; Janssens *et al.*, 2012]. A titre d'exemple, dans une étude récente, la survie après évolution clonale est de 32 mois (n=105) [Cavazzini *et al.*, 2012]; dans cette série, les évolutions clonales correspondent à des translocations impliquant le gène *IGH@* et des délétions 17p, 11q, 13q et 14q32 qui surviennent en un délai médian de 64 mois chez 14% des patients.

De façon générale, **l'évolution clonale** est un élément clé de la rechute et de la progression au cours des cancers. En ce sens, l'étude de Landau *et al.* [2013] a évalué les fractions cellulaires porteuses de mutations et de variation du nombre de copies dans une série de 149 patients atteint de LLC (par séquençage « whole exome » et SNP-array). Ce travail identifie 20 mutations (*TP53*, *ATM*, *MYD88*, *SF3B1*, *NOTCH1*, *DDX3X*, *ZMYM3*, *FBXW7*, *MAPK1*, *XPO1*, *CHD2*, *POT1*, *NRAS*, *KRAS*, *BCOR*, *EGR2*, *MED12*, *RIPK1*, *SAMHD1*, *ITPKB*, *HIST1H1E*) et 5 déséquilibres chromosomiques récurrents (délétion 8p, délétion 13q, délétion 11q, trisomie 12 et délétion 17p). Certaines de ces anomalies sont initiatrices (« drivers »), précoces, spécifiques de la transformation des cellules B et exclusivement clonales (*MYD88*, trisomie 12, délétion 13q). Leur apparition est favorisée par l'âge et la présence de mutation des IgV_H, qui constituent 2 facteurs facilitant également l'accumulation de mutations somatiques non récurrentes (« passagers ») (**Figure 18**). D'autres drivers apparaissent ensuite tardivement, lors de la progression ; ces anomalies sous-clonales ne sont pas nécessairement des drivers spécifiques de la LLC et sont fréquemment observées dans d'autres cancers, (*SF3B1*, *TP53*, délétion 11q, *RAS*). Selon la nature des sous-clones, leur agressivité et l'administration d'un traitement, l'évolution clonale peut être linéaire ou non linéaire. Dans la plupart des LLC non traitées et dans quelques LLC traités, l'équilibre des sous-clones se maintient dans le temps. Par contre, en cas de driver fort, le traitement peut perturber cet équilibre et favoriser l'émergence d'un sous-clone initialement faiblement représenté. Ainsi, parmi 18 patients testés de façon séquentielle, 10/12 patients traités par chimiothérapie ont présenté une évolution clonale, incluant essentiellement des drivers qui s'expandent avec le temps (contre 1/6 patients non traités).

Les **anomalies complexes**, corrolaires de l'évolution clonale, sont souvent sous-estimées par la cytogénétique conventionnelle (16% à 18% des cas) : elles peuvent être étudiées de façon optimale par la technique de CGH-array. Brugor *et al.* a récemment

Figure 19 : Structure du gène *TP53* et de la protéine p53



rapporté l'intérêt d'une nouvelle technique de CGH-array extrêmement résolutive dans une série de 58 patients (nommée ROMA, pour Representational Oligonucleotide Microarray Analysis). Seul un patient de la série (1,7%) présente un profil génomique normal, contre 20% avec la FISH, 17% avec le caryotype conventionnel et 15% avec d'autres puces à ADN. Cette méthode confirme par ailleurs que les anomalies, récurrentes ou non, sont plus fréquemment des délétions que des amplifications, ont une taille médiane de 933 kb et sont présentes en nombre très variable selon les patients ; cette approche permet également de borner de façon précise les déséquilibres et de mettre en évidence des évolutions clonales.

Il a récemment été démontré que les altérations de *TP53*, les délétions 11q, les délétions 13q14 (type II emportant *RB1*) et l'expression de CD38 constituent des marqueurs indépendant prédictifs de la complexité génomique au cours de la LLC ; les anomalies de *TP53* prédisent à elles seules 50% des anomalies complexes [Ouillette *et al.*, 2010].

5.2. Mutations somatiques

5.2.1. Mutations du gène *TP53*

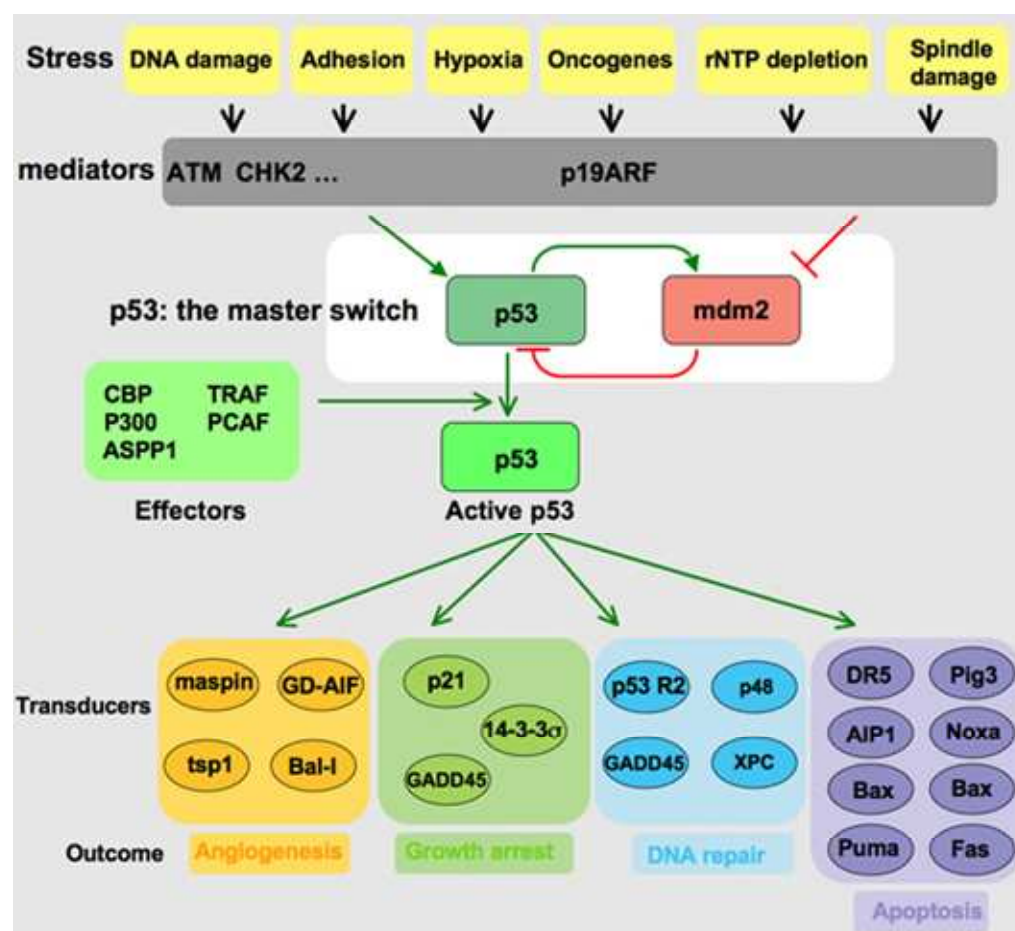
5.2.1.1. Structure du gène *TP53* et de la protéine p53

Le gène *TP53*, long d'environ 23 kb, est localisé en 17p13.1 [revue par Xu-Monette *et al.*, 2012]. Il comporte 11 exons et 10 introns, le premier exon étant non codant. Le gène est sous le contrôle de 2 promoteurs dont le premier est situé en amont du premier exon et le second au début du premier intron.

La protéine p53 canonique est constituée de 393 acides aminés et sa masse moléculaire est de 53kDa. Elle est composée de 5 domaines fonctionnels : un domaine de transactivation NH2-terminal, un domaine riche en proline, un domaine central de liaison spécifique à l'ADN, un domaine d'oligomérisation et un domaine de régulation (**Figure 19**).

Ces cinq domaines permettent de définir la protéine p53 comme **facteur de transcription**. Le domaine central suffit à déterminer la reconnaissance des sites consensus de liaison de p53 au niveau de ses cibles transcriptionnelles, alors que les domaines N- et C-terminaux peuvent être remplacés par des domaines fonctionnellement homologues à d'autres facteurs de transcription.

Figure 20 : Représentation schématique de la voie p53



5.2.1.2. Régulation de l'expression de p53

Transcription du gène

La protéine p53 est **constitutivement exprimée** dans tous les types cellulaires. Le promoteur de *TP53* contient des séquences de fixation de différents facteurs de transcription tels que NF1, C-MYC, SP1, NFkB, et même p53 (rétrocontrôle négatif direct de *TP53* par son propre produit) [Deffie *et al.*, 1993].

Régulation post-transcriptionnelle et stabilité de la protéine

Les quantités intracellulaires de p53 sont régulées essentiellement au niveau post-transcriptionnel (**Figure 20**). En effet, une boucle de régulation négative a été mise en évidence entre les protéines p53 et MDM-2. La protéine p53 est capable d'activer la transcription de *MDM-2* par l'intermédiaire d'une séquence de liaison à p53 localisée dans le premier intron du gène *MDM-2*. La protéine MDM-2, qui se lie à p53 dans sa région N-terminale, empêche toute interaction avec les facteurs de la machinerie transcriptionnelle et ubiquitinye p53 qui ensuite va être dégradée rapidement par le protéasome. Ce phénomène d'auto-régulation explique la $\frac{1}{2}$ vie très courte de la protéine dans les cellules au repos (20 à 30 minutes).

En cas de stress cellulaire (radiations, agents toxiques, lésions de l'ADN, carence en facteur de croissance, etc...), p53 est stabilisée par des modifications post-transcriptionnelles et s'accumule dans le noyau. Les phénomènes de phosphorylation, acétylation et méthylation dissocient MDM2 et p53, qui échappe ainsi à l'ubiquitylation et est activée. A l'inverse, la sumoylation et la neddylation augmente la stabilité de p53 en inhibant l'ubiquitylation, mais réprime sa fonction [Xu-Monette *et al.*, 2012].

5.2.1.3. Rôles de TP53

5.2.1.3.1. Données générales

Le gène *TP53*, considéré comme **suppresseur de tumeur et gardien de l'intégrité du génome**, code pour la protéine p53 qui agit comme facteur de transcription impliqué dans le développement, la différenciation cellulaire et le vieillissement.

L'effet de l'activation de p53 dépend de la séquence temporelle de régulation de ses nombreuses cibles. De façon générale, ses gènes cibles vont collectivement forcer la cellule à **stopper la réplication de l'ADN, soit en induisant l'apoptose, soit en favorisant un arrêt transitoire ou permanent du cycle cellulaire** (**Figure 20**) [Oren et Rotter, 1999]. Ainsi, la

NUCLEUS

Transrepression (OFF) → Ub → p53 → p53

Transactivation (ON) → p53 → p53

CYTOPLASM

Transcription-independent Activities

p53 → Mcl-1, Bcl-2, Bcl-X

p53 → mTOR pathway → Autophagy

p53 → BID, BAD, BAX, BAK, BIM → Cyt c → APAF-1 → CASP-9 → CASP-3 → Apoptosis

Transcription-dependent Activities

Cell cycle, DNA repair, Transcription factors, MDM2, Apoptosis, Signaling, microRNAs, Metabolism

Apoptosis; Cell cycle arrest; DNA repair; Senescence; Autophagy

Les pointillés rouges indiquent une régulation positive de l'expression des gènes et les pointillés verts une régulation négative.



protéine p53 peut être comparée à un « arrêt d'urgence » qui conduit la cellule à stopper sa prolifération lorsque les conditions de réplication correcte de l'ADN ne sont pas rassemblées, afin d'éviter la survenue d'aberrations génomiques pouvant participer au développement d'un cancer. Le choix entre arrêt du cycle cellulaire et apoptose dépend du type cellulaire, du stade dans le cycle cellulaire, de la gravité des lésions de l'ADN, du niveau de p53, des facteurs de survie externes et des paramètres cellulaires internes [Vousden et Lu, 2002]. Les lymphocytes sont plutôt sujets à l'apoptose en cas de stress, par comparaison avec d'autres types cellulaires [Gudkov et Komarova, 2003].

La fonction suppresseur de tumeur de p53 va s'exercer **de façon dépendante ou indépendante de son rôle transcriptionnel (Figure 21)**.

Effets dépendants de l'activité transcriptionnelle

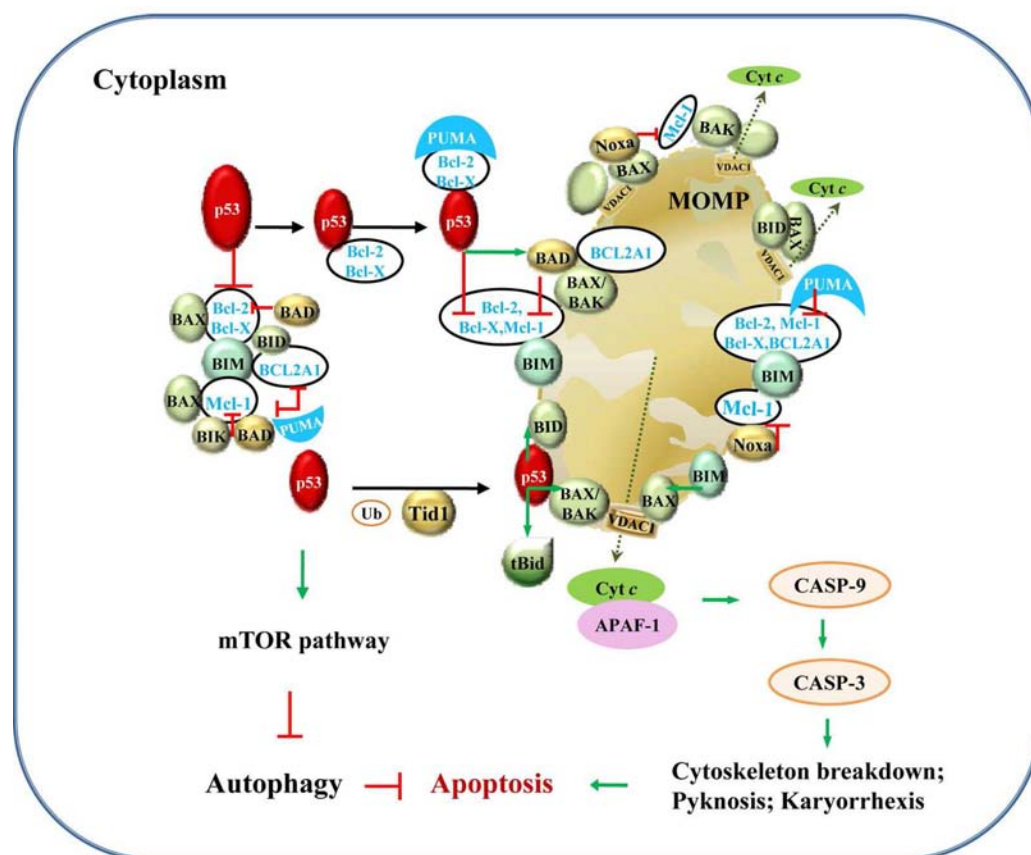
En cas d'activation, la protéine p53 peut se lier sous forme tétramérique à ses séquences cibles et réguler positivement ou négativement l'expression de centaines de **gènes cibles, qui incluent des régulateurs du cycle cellulaire, de l'apoptose, de la réparation de l'ADN et de la différenciation (Figure 22)**. Les cibles prédominantes de p53 sont les gènes suivants :

- **P21** qui code un inhibiteur des complexes cyclineE/cdk2 et constitue un médiateur de l'activité antiproliférative de p53 [El-Deiry *et al.*, 1993],
- **MDM-2** (Murine double minute 2) qui code une protéine complexant p53 et inhibant son activité transcriptionnelle [Barak *et al.*, 1993],
- **GADD45** (Growth Arrest & DNA Damage) qui code une protéine antiproliférative [Kastan *et al.*, 1992],
- **BAX** impliqué dans l'induction de l'apoptose [Miyashita et Reed, 1995],
- et **PUMA** (p53-upregulated modulator of apoptosis), un gène pro-apoptotique, membre de la famille *BCL2*, modulant l'activité de *BAX* pour faciliter le relargage du cytochrome C et ainsi induire une cascade apoptotique [Yu *et al.*, 2001].

De façon intéressante, **p53 régule la transcription de nombreux microARN**, courtes séquences d'ARN simple-brin qui se lient à des séquences complémentaires d'ARN cibles, induisant leur dégradation ou l'absence de traduction [Xu-Monette *et al.*, 2012]. Parmi ces microARN dont l'expression est transactivée par p53 se trouvent **mir-15a** et **miR-16-1** (qui ciblent l'oncogène *MYB* et les gènes anti-apoptotiques *BCL2* et *MCL1*), **mir-34a** (qui cible l'oncogène *FOXP1* et *BCL2*), **miR-34b** et **mir34c** (qui cible *ZAP70*).

Figure 23 : Représentation schématique du rôle non transcriptionnel de p53 dans l'apoptose et l'autophagie

Les flèches vertes indiquent les interactions protéines-protéines positives ; les lignes rouges indiquent les interactions protéines-protéines négatives ; Ub indique ubiquitinylation ; MOMP signifie perméabilisation de la membrane mitochondriale externe ; and VDAC1, voltage-dependent anion-selective channel protein 1



Effets indépendants de l'activité transcriptionnelle

Ce mode d'action de p53, indépendant de son rôle de facteur de transcription, intervient dans l'induction de l'apoptose mitochondriale et l'inhibition de l'autophagie ; il est médié par des interactions protéines-protéines avec les membres de la famille BCL2 et de la voie mTOR (**Figure 23**).

5.2.1.3.2. Contrôle du cycle cellulaire

Une des fonctions la mieux connue de p53 est sa capacité à induire **un arrêt du cycle cellulaire en phase G1**. Ce contrôle de l'entrée en phase S semble être essentiellement relié à son activité transcriptionnelle sur *P21* [El-Deiry *et al.*, 1993]. La régulation positive de *P21* par p53, en réponse à des altérations génomiques, inhibe l'activité de la cycline E/cdk2, ce qui permet alors l'accumulation de RB sous sa forme hypophosphorylée [Demers *et al.*, 1994] et l'arrêt du cycle cellulaire.

L'intervention de p53 au point de restriction G1/S est essentielle mais p53 intervient également dans **l'arrêt entre les phases G2 et M du cycle cellulaire** [Taylor *et al.*, 2001]. Le facteur clé pour cette transition G2/M est le complexe cycline B1/CDC2 qui est cytoplasmique et ne rentre dans le noyau qu'au moment de la mitose. Le gène *14-3-3s*, transactivé par p53, est capable de séquestrer ce complexe cycline B1/CDC2 dans le cytoplasme pour provoquer un arrêt de la division en G2. Un second gène transactivé par p53, *GADD45*, est également important pour le contrôle de la transition G2/M. L'invalidation de ce gène chez les souris conduit à un phénotype très proche de celui des souris nullizygotes pour le gène *TP53* : une forte aneuploïdie et de nombreuses anomalies chromosomiques. La surexpression de *GADD45* est capable d'induire un blocage de la division cellulaire en phase G2.

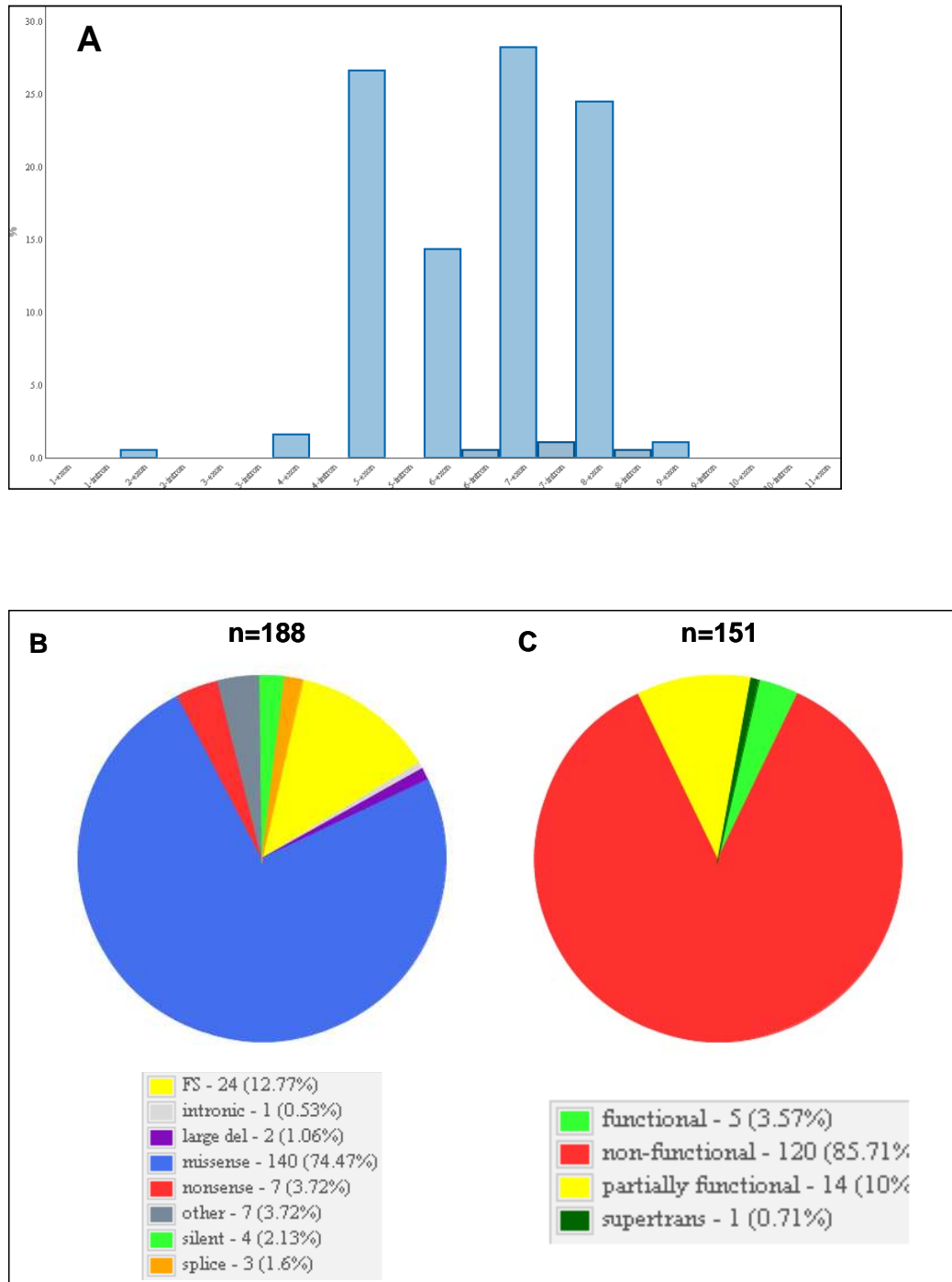
5.2.1.3.3. Apoptose

Une fonction importante de p53 réside dans sa capacité à **induire l'apoptose** par l'activation transcriptionnelle de gènes pro-apoptotiques (par exemple *PUMA*, *APAF*, *NOXA*, *BAX* ou *FAS*) et par la répression transcriptionnelle de gènes anti-apoptotiques (par exemple *BCL2*, *BCLXL* ou *survivine*).

p53 intervient également dans l'apoptose par des interactions directes protéines-protéines (Figure xx). En cas de stress, PUMA sequestre BCL2 et BCLXL, qui s'associent avec p53 cytoplasmique. En 30 minutes, p53 cytoplasmique liée à ces protéines antiapoptotiques transloque dans la mitochondrie, où elle libère BAX, BAK, BIM et BID de

Figure 24 : Profil mutationnel de *TP53* au cours de la LLC (données issues de la base de données IARC mise à jour en novembre 2012, version R16 [Petitjean *et al.*, 2007])

A/ Répartition des mutations entre exons et introns. **B/** Types de mutations **C/** Effet fonctionnel des mutations ponctuelles



BCL2, BCLXL, BCL2A et MCL1. NOXA agit de la même façon que TP53. BAX, BAK et BID forment des hétéro- ou homo-oligomères et provoquent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, entraînant la libération du cytochrome C. Le cytochrome C s'associe alors avec APAF-1 ; ils activent ensemble la cascade des caspases menant à l'apoptose, précédant une deuxième vague d'apoptose induite par l'activité transcriptionnelle de p53.

5.2.1.3.4. Autres fonctions

p53 intervient dans l'autophagie selon un mécanisme non transcriptionnel mal connu à l'heure actuelle. D'autres travaux ont montré le rôle de p53 dans la sénescence répllicative [Bond *et al.*, 1994], la réplication et la réparation de l'ADN [Wang *et al.*, 1995], la différenciation [Aloni-Grinstein *et al.*, 1993], l'angiogénèse [Dameron *et al.*, 1994] et le développement [Sah *et al.*, 1995].

5.2.1.4. Inactivation de p53 au cours de la LLC

Il existe plusieurs modes d'inactivation des fonctions suppressives de p53, qui surviennent au niveau de l'ADN, de l'ARN ou de la protéine.

Au niveau génomique, il s'agit le plus souvent d'une inactivation bi-allélique par délétion d'un allèle et mutation somatique de l'autre : 80% à 90% des patients porteurs d'une délétion 17p présentent une mutation sur l'allèle restant [Zenz *et al.*, 2008]. Cependant, des mutations sans délétion allélique sont également observées dans 4 à 5% des cas de LLC. Des mutations bi-alléliques ont également été décrites.

La majorité des mutations sont des mutations ponctuelles situées au niveau du domaine de liaison à l'ADN ; ce sont fréquemment des mutations faux-sens, moins souvent des insertions-délétions, des mutations non-sens ou des mutations des sites d'épissage (**Figure 24A et 24B**) [Petitjean *et al.*, 2007 ; Zenz *et al.*, 2010 (a)]. Bien que les codons 175, 179, 209, 248, 273 soient plus fréquemment touchés, la localisation des mutations est hautement variable ; la base de données IARC recense 188 mutations différentes à l'heure actuelle dans la LLC. Ces mutations entraînent la plupart du temps une perte de fonction totale ou partielle ; certains mutants conservent cependant leur fonction de transactivation (**Figure 24C**) [Kato *et al.*, 2003 ; Petitjean *et al.*, 2007]. Les mutations *TP53* résultent

souvent en une diminution de la dégradation par le protéasome via MDM2, conduisant à l'accumulation de protéine p53 mutante [Brosh & Rotter, 2009] ; celle-ci exerce fréquemment un effet dominant-négatif sur la liaison à l'ADN et l'action transactivatrice de la protéine sauvage, ce qui peut expliquer les anomalies fonctionnelles de TP53 même en cas de mutation mono-allélique sans délétion associée [Petitjean *et al.*, 2007]. D'autres travaux, menés sur des souris hétérozygotes *TP53*^{+/-}, porteuses d'un allèle nul et d'un allèle fonctionnel, démontrent que la diminution du dosage génique est suffisante pour favoriser le développement de cancers, sans nécessairement que l'inactivation de *TP53* soit bi-allélique [Venkatachalam *et al.*, 1998].

Des silencing de *TP53* par méthylation de son promoteur ou de son UTR ont également été rapportés dans la LLC [Xu-Monette *et al.*, 2012].

Au niveau de l'ARN, l'épissage alternatif, éventuellement favorisé par une mutation de site d'épissage, peut induire une activité transcriptionnelle sélective de p53, ou au contraire une perte d'activité transcriptionnelle. Certains microARN (miRs-25, -30d, -92a, -125b, 504, -1285, -141, -15 et -16) peuvent également interférer au niveau post-transcriptionnel et diminuer la traduction de p53.

Au niveau protéique, une inactivation fonctionnelle de p53 (exprimée dans ce cas de façon normale) peut être la conséquence d'une interaction inhibitrice avec une autre protéine ou d'une séquestration cytoplasmique empêchant son activité transcriptionnelle. L'inactivation d'ATM, fréquente au cours de la LLC, peut également entraîner une diminution de l'activation de p53. Enfin, la présence de SNP (Single Nucleotide polymorphism) au niveau du codon 72 de *TP53* (Arg/Pro) et au niveau du codon 31 de *P21* (Ser/Arg) pourrait affecter la fonction de *TP53* et avoir une influence sur l'évolution clinique au cours de la LLC, au même titre que les mutations du gène *TP53* [Johnson *et al.*, 2009 ; Bilous *et al.*, ASH 2012].

5.2.1.5. Fréquence et conséquences cliniques des mutations *TP53* au cours de la LLC

Des mutations de *TP53* sont présentes chez **4% à 37%** des patients atteints de LLC selon les séries; elle est plus fréquente à la rechute ou chez les patients réfractaires (environ 10% dans les séries de patients non sélectionnés, 30% chez les patients en rechute et jusqu'à

37% chez les patients réfractaires à la fludarabine) [Grever *et al.*, 2007 ; El Rouby *et al.*, 1993 ; Fenaux *et al.*, 1992 ; Gaidano *et al.*, 1991 ; Trbusek *et al.*, 2006 ; Wattel *et al.*, 1994 ; Zenz *et al.*, 2007 ; Lin *et al.*, 2002 ; Dicker *et al.*, 2009 ; Schnaiter *et al.*, ASH 2012].

Au même titre que la délétion 17p, la présence de mutations *TP53* (avec ou sans délétion 17p associée) est associée à la **résistance au traitement** par les analogues de purines, comme la fludarabine utilisée dans l'association de première ligne RFC, par les agents alkylants et par les irradiations γ . La présence d'une mutation de *TP53* constitue à ce titre d'un facteur de pronostic très péjoratif en terme de survie globale et survie sans traitement [Zenz *et al.*, 2008 ; Malcikova *et al.*, 2009 ; Zenz *et al.*, 2009 ; Dicker *et al.*, 2009 ; Rossi *et al.*, 2009 ; Zenz *et al.*, 2010 (b) ; Gonzales *et al.*, 2011]. Au sein de l'ensemble des mutations du gène *TP53*, les mutations faux-sens survenant au niveau du domaine de liaison à l'ADN se distingueraient par un impact pronostique extrêmement défavorable [Trbusek *et al.*, 2011].

Les résultats à 6 ans de l'essai allemand GCLLSG CLL3X démontrent cependant que l'allogreffe non-myéloablative constitue une option thérapeutique permettant le contrôle à long terme de la maladie même en cas de mutation *TP53* [Dreger *et al.*, 2013].

L'inactivation de p53 prédispose de façon générale à **l'accumulation de multiples aberrations génomiques**, du fait de la perte de contrôle de l'entrée en phase S. Au cours de la LLC, la présence de mutations *TP53* (tout comme la délétion 17p) est effectivement associée à un nombre significativement plus élevé d'anomalies génomiques (2,4 anomalies en cas de mutation *TP53* versus 1,3 anomalies en l'absence de mutations *TP53*, d'après Zenz *et al.*, 2008), ce qui participe également à expliquer le pronostic très péjoratif des patients *TP53*^{mut}.

Ainsi, cette inactivation, qui survient la plupart du temps durant l'évolution de la maladie, participe à la progression des pathologies tumorales, notamment en favorisant l'accumulation d'anomalies génomiques. Deux hypothèses sont discutées pour expliquer la survenue de mutations *TP53* durant l'évolution de la maladie : soit la mutation *TP53* survient *de novo* lors de la progression de la maladie, soit la mutation est présente dès le diagnostic, dans un clone initial de petite taille qui se développera sous la pression sélective du traitement. Dans une étude récente, aucune évolution clonale (sous forme de nouvelles mutations *TP53*) n'a été mise en évidence après chimiothérapie, immunothérapie ou greffe de

moelle [Pekova *et al.*, 2011]. D'autre part, le profil mutationnel dans la LLC n'est pas différent avant et après traitement dans la série de 254 patients étudiés par Zenz *et al.* [2010 (a)] suggérant que le mécanisme de développement des mutations est le même dans les 2 cas ; il serait donc indépendant du traitement. Cependant, très récemment, le travail d'analyse séquentielle du statut mutationnel de Grossmann *et al.* [ASH 2012] démontre qu'une faible fraction de LLC comporte un sous-clone muté pour *TP53* dès le diagnostic, sous-clone qui augmente en taille lors de l'évolution. De plus, dans de nombreuses études, la présence de mutations *TP53* est fortement associée à la réalisation d'une chimiothérapie préalable. Il a d'ailleurs été suggéré que l'exposition aux agents alkylants serait responsable du développement des mutations *TP53* et de la résistance au traitement de 2^{ème} ligne [Sturm *et al.*, 2003].

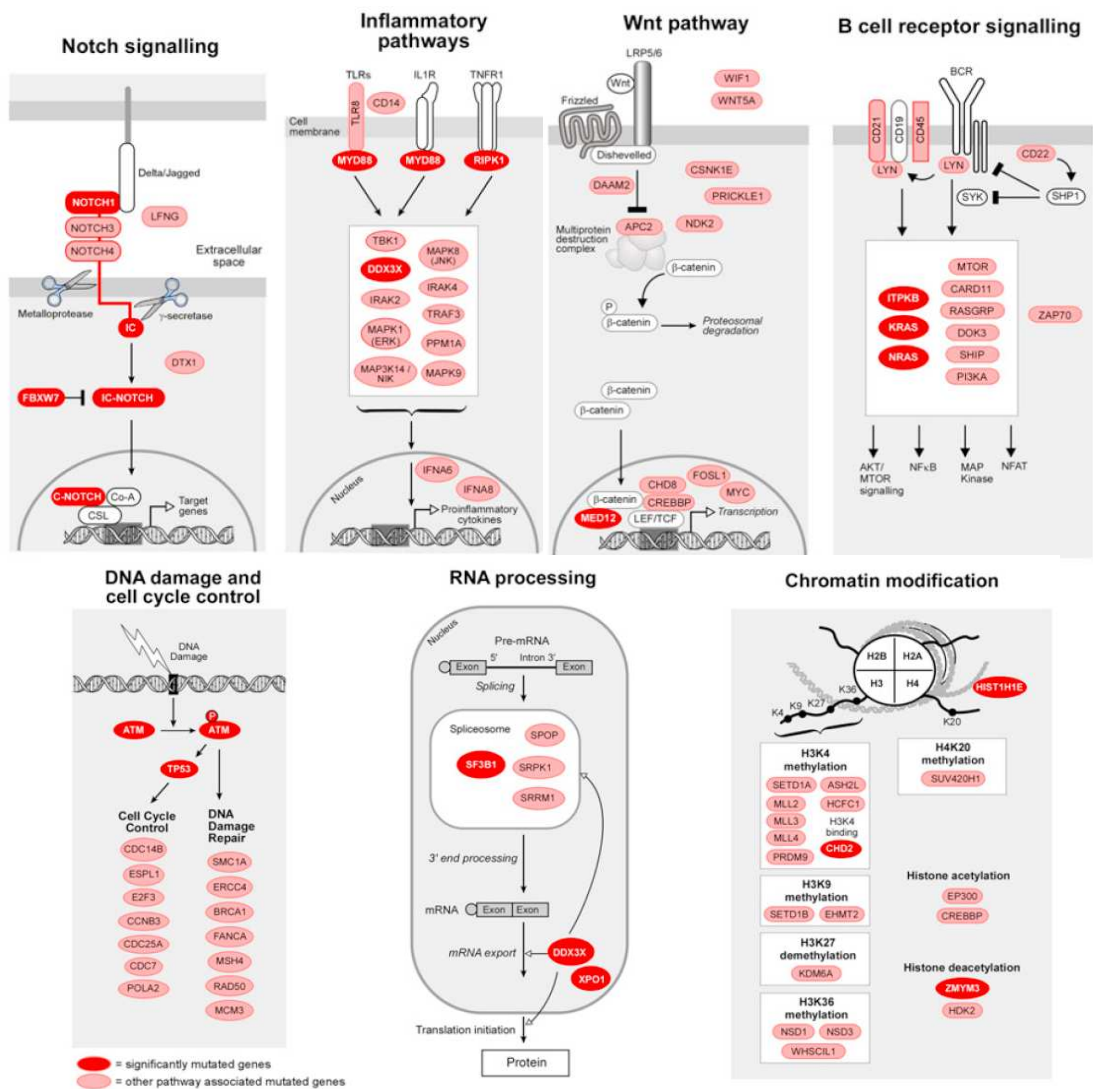
5.2.2. Mutations du gène ATM

A l'image des mutations *TP53* associées aux délétions 17p, des mutations de l'allèle *ATM* restant ont été mises en évidence chez les patients porteurs de délétion 11q ; ces inactivations bi-alléliques par mutation+délétion sont cependant moins fréquentes que pour *TP53* et concernent 36% des LLC 11q- [Austen *et al.*, 2007]. Des mutations sporadiques mono ou bi-alléliques d'*ATM* ont également été rapportées en l'absence de toute délétion chez 7% à 20% des patients [Stankovic *et al.*, 1999 ; Austen *et al.*, 2005 ; Britt-Compton *et al.*, 2012 . Skowronska *et al.*, 2012 (a)]. Il s'agit majoritairement de mutation tronquantes et de mutations faux-sens.

Dans certains cas, la présence d'une mutation mono-allélique d'*ATM* est un événement germinale, suggérant que les patients hétérozygotes pour l'Ataxie-Télangiectasie seraient prédisposés à la survenue de LLC [Bullrich *et al.*, 1999]. L'étude de la fréquence de ces mutations constitutionnelles chez des patients atteints de LLC porteurs ou non de délétion 11q a permis de démontrer que l'hétérozygotie germinale d'*ATM* n'intervient pas dans l'initiation de la LLC mais influence la progression rapide de la maladie via la perte de l'allèle *ATM* sain [Skowronska *et al.*, 2012 (b)].

Sur un plan clinique, les mutations du gène *ATM* ont été rapportées comme marqueurs défavorables s'accompagnant d'une survie globale et d'une survie sans traitement raccourcies [Austen *et al.*, 2005]. Plus récemment, dans l'essai anglo-saxon CLL4, ce sont les anomalies bi-alléliques d'*ATM* qui ont été spécifiquement associées à une survie sans progression et à

Figure 25 : Mutations récurrentes de la LLC : rôle des gènes concernés dans les voies de signalisation ou processus cellulaires, d'après Landau *et al.*, 2013



une survie globale plus courte qu'en cas d'anomalie mono-allélique [Skowronska *et al.*, 2012 (a)]. Dans cette série, la survie sans progression des patients présentant une altération bi-allélique d'*ATM* est d'ailleurs semblable à celles des patients porteurs d'une altération de *TP53*. A l'inverse, la survie sans progression des patients non mutés pour *ATM* et des patients porteurs d'une mutation mono-allélique isolée est similaire (28,6 mois vs 30,7 mois).

D'autre part, l'observation dans cette série d'une survie sans progression plus courte en cas de délétion mono-allélique d'*ATM* (17,1 mois) qu'en cas de mutation mono-allélique d'*ATM* sans délétion 11q associée (30,7 mois) constitue un argument supplémentaire pour penser que d'autres gènes, situés sur le bras long du chromosome 11, sont impliqués dans la pathogénie des LLC. En ce sens, il a récemment été démontré que le gène *BIRC3*, situé en 11q22, joue un rôle dans la physiopathologie des formes chimiorésistantes de LLC [Rossi *et al.*, 2012].

5.3. Nouvelles mutations

Les techniques de séquençage haut débit ont récemment permis de mettre en évidence de nouvelles mutations récurrentes [Puente *et al.*, 2011 ; Quesada *et al.*, 2011 ; Wan *et al.*, ASH 2011], dont la valeur pronostique a ensuite été démontrée. Les gènes atteints sont impliqués dans diverses voies de signalisation ou processus cellulaires résumés dans la **Figure 25**.

Mutations de *BIRC3*

Le gène *BIRC3*, qui code un régulateur négatif de la voie NFkB non canonique, peut être muté au cours de la LLC. Les mutations ciblent 3 hotspots situés dans les exons 5, 7 et 10. Ces mutations sont rares au diagnostic (4%) et semblent inexistantes au cours des MBL [Rossi *et al.*, 2012]. Les patients évolutifs mais sensibles à la fludarabine sont également exempts de telles mutations. Par contre, elles affectent les patients réfractaires à la fludarabine (24%) ; de façon intéressante, les mutations de *BIRC3* et les altérations de *TP53* sont mutuellement exclusives dans ce sous-groupe de patients. Les mutations de *BIRC3* constitueraient donc un nouveau marqueur génétique de la chimiorésistance. Elles sont de plus associées à une évolution défavorable similaire à celles des patients délétés ou mutés pour *TP53* ; dans la série de Rossi *et al.* [2012], leur valeur pronostique est indépendante de celles des facteurs pronostiques reconnus.

Cependant, un travail récent a démontré que la délétion totale ou partielle du gène *BIRC3*, situé en 11q22, est toujours associée à la perte d'*ATM*, du fait d'un même et unique événement de délétion [Rose-Zerilli *et al.*, ASH, 2012]. Dans cette série enrichie en patient porteurs de délétion 11q, 83% des patients 11q- présentent une co-délétion des gènes *BIRC3* et *ATM*. Les autres délétions 11q identifiées n'intéressent ni *ATM* ni *BIRC3*. D'autre part, parmi les patients 11q- (avec délétion de *BIRC3*), seuls 3 patients (5%) présentent une mutation de l'allèle restant de *BIRC3*. Ainsi, devant la concordance entre la délétion d'*ATM* et de *BIRC3* et la faible incidence des mutations de *BIRC3*, il semble nécessaire pour les auteurs de réévaluer la valeur pronostique de la disruption de *BIRC3* dans des cohortes de patients non traités.

Mutations de NOTCH1

Les mutations du gène *NOTCH1*, codant une protéine transmembranaire agissant comme facteur de transcription induit par un ligand, se situent préférentiellement dans le domaine PEST (exon 34). Elles ont été associées à un **pronostic défavorable**, avec une survie globale et une survie sans traitement raccourcie dans plusieurs études rétrospectives [Fabbri *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2011 ; Del Giudice *et al.*, 2012].

Elles concernent environ 10% des patients au diagnostic ; leur incidence est plus fréquente au cours des transformations en syndrome de Richter (30%) et des LLC réfractaires à la chimiothérapie (20%) [Fabbri *et al.*, 2011]. Les mutations de *NOTCH1* sont également plus fréquentes en cas de trisomie 12 (24 à 41% des cas), ce qui conférerait un pronostic plus péjoratif qu'en cas de trisomie 12 isolée [Balatti *et al.*, 2012 ; Del Giudice *et al.*, 2012 ; Lopez *et al.*, 2012]. Cependant, au sein des LLC réfractaires à la fludarabine, cette corrélation entre mutation de *NOTCH1* et trisomie 12 n'a pas été retrouvée. Enfin, les mutations de *NOTCH1* sont associées à l'absence de mutation des IgV_H, à une expression forte de CD38 et ZAP70, à un stade avancé et à un taux de LDH élevé [Puente *et al.*, 2011 ; Quesada *et al.*, 2011 ; Rossi *et al.*, 2012 ; Schnaiter *et al.*, ASH 2012 ; Villamor *et al.*, 2012 ; Oscier *et al.*, 2013].

Une étude prospective récente a évalué l'impact des mutations de *NOTCH1* dans une cohorte de 494 patients traités par chlorambucil + fludarabine +/- cyclophosphamide en première ligne (protocole UK LRF CLL4) [Oscier *et al.*, 2013]. Ces mutations sont corrélées à une diminution de la survie globale (54,8 vs 74,6 mois, p = 0,02) et sans progression (22 vs 26,4 mois, p = 0,02). En analyse multivariée, malgré l'impact prédictif majeur des anomalies de *TP53* pour la survie, les mutations de *NOTCH1* présentent une valeur pronostique indépendante.

L'analyse séquentielle de 200 patients a démontré que l'acquisition de la mutation *NOTCH1* au cours de l'évolution de la maladie est rare (0,5%) [Villamor *et al.*, 2012]. De la même façon, elle persiste en général après traitement (seuls 1% des patients perdent la mutation). Dans cette étude, les patients *NOTCH1*^{mut} en stade A ou B selon Binet présentent une survie sans traitement raccourcie. D'autre part, la présence d'une mutation *NOTCH1* augmente significativement le risque de transformation en lymphome B diffus à grandes cellules, indépendamment du statut IgVH. Ce marqueur permettrait donc d'identifier précocement un sous-groupe de patient à haut risque de transformation et à évolution défavorable.

De façon intéressante, l'étude récente de Ysebaert *et al.* [ASH 2012] n'a pas mis en évidence de corrélation entre les mutations de *NOTCH1* et la survie (survie globale et survie sans traitement) parmi une cohorte de 164 patients, dont 108 ont été traités de façon homogène par RFC ; ce travail suggère que ce traitement par RFC pourrait gommer la valeur pronostique péjorative conférée par la présence de la mutation *NOTCH1*. Enfin, parmi les patients réfractaires à la fludarabine traités par alemtuzumab (essai CLL2H), la survie sans progression est significativement plus prolongée en cas de mutation *NOTCH1* (médiane 15.47 mois (muté) vs 6.74 mois (WT), $p=0.025$), mais il n'y a pas de différence entre les 2 groupes en terme de survie globale (médiane non atteinte (muté) vs. 18.3 mois (WT), $p=0.181$) [Schnaiter *et al.*, ASH 2012].

Mutations de *SF3B1*

Les mutations du gène *SF3B1*, codant un constituant critique du spliceosome, sont mises en évidence dans 5% des LLC au diagnostic et dans 17% des LLC réfractaires à la fludarabine [Rossi *et al.*, 2011 ; Schnaiter *et al.*, ASH 2012 ; Quesada *et al.*, 2011].

Ces mutations, majoritairement faux-sens, sont situées essentiellement dans les exons 12 à 18 ; elles ciblent de façon récurrentes 3 hotspots dans l'exon 14 (codons 662, 666, et 700, la mutation K700E étant la plus récurrente) et sont associées à la présence de délétion 11q [Wan *et al.*, ASH 2011 ; Schnaiter *et al.*, ASH 2012 ; Wan *et al.*, ASH 2012]. Les mutations de *SF3B1* et de *NOTCH1* semblent généralement mutuellement exclusives [Ysebaert *et al.*, ASH 2012 ; Schnaiter *et al.*, ASH 2012].

La présence de mutations de *SF3B1* s'accompagne d'un raccourcissement de la survie sans traitement et de la survie globale, ce qui leur confère une **valeur prédictive péjorative** [Rossi *et al.*, 2011 ; Wan *et al.*, ASH 2012] ; cependant, parmi les LLC réfractaires à la

fludarabine de l'essai CLL2H, il semble que cette valeur pronostique soit inexistante [Schnaiter *et al.*, ASH 2012]. Parallèlement aux mutations NOTCH1, le travail d'Oscier *et al.* [2013] a évalué de façon prospective l'impact des mutations de *SF3B1* dans la cohorte de 494 patients du protocole UK LRF CLL4. Ces mutations sont associées à une diminution de la survie globale (54.3 vs 79.0 mois, $p < 0,001$). En analyse multivariée, les mutations de *SF3B1* présentent par ailleurs une valeur pronostique indépendante, bien que les anomalies de *TP53* restent le marqueur le plus informatif de la survie.

Un travail récent a rapporté que l'absence de mutation des IgV_H et la présence de mutations de *SF3B1* et de *XPO1* sont plus fréquentes chez les patients qui acquièrent une mutation *TP53* au cours de la maladie ; ceci suggère que ces marqueurs seraient des facteurs de risque potentiels pour l'acquisition de mutation *TP53* [Grossman *et al.*, ASH 2012].

Mutations de MYD88

La mutation L265P du **gène MYD88** (*myeloid differentiation primary response gene 88*), initialement décrite au cours de la maladie de Waldenström, a par la suite été rapportée au cours de la LLC [Puente *et al.*, 2011]. Ce gène code une protéine participant aux voies de signalisation de l'IL-1 et des récepteurs Toll-like, comme STAT3 et NFκB. Cette anomalie est plus fréquente chez les patients jeunes (médiane = 43 ans) ; elle s'observe majoritairement chez des patients mutés pour les IgV_H [Puente *et al.*, 2011]. Bien que la présentation clinique des patients *MYD88*^{mut} soit généralement plus agressive dans cette série (stade plus avancé au diagnostic), aucune différence entre les patients mutés ou non mutés n'a été mise en évidence en terme de progression ou de survie.

Autres mutations

Des mutations du **gène XPO1** (*exportine 1*) ont également été mises en évidence par les techniques de séquençage haut-débit, uniquement chez des patients non mutés pour les IgV_H [Puente *et al.*, 2011]. Ce gène est impliqué dans l'export nucléaire de protéines et ARNm ; 2 mutations distinctes touchant le même codon d'une région hautement conservée ont été rapportées (E571K et E571G).

Le gène KLHL6 (*kelch-like protein 6*) -qui est impliqué dans la formation du centre germinatif- peut également faire l'objet de mutations au cours de la LLC, particulièrement

dans les formes mutées pour les IgV_H [Puente *et al.*, 2011]. Il pourrait s'agir de la cible de phénomènes d'hypermutations somatiques, comme cela est connu pour les IgV_H et pour certains proto-oncogènes comme *BCL-6* et *MYC* dans les lymphomes.

Enfin, un travail récent de séquençage haut-débit portant sur une série de 91 patients a mis en évidence de nouvelles mutations de gènes impliqués dans la signalisation NOTCH (*FBXW7*), les voies de l'inflammation (*MAPK1*) et les phénomènes d'épissage et de traitement de l'ARN (*DDX3X*) [Wan *et al.*, ASH 2011]. Comme nous l'avons vu précédemment, d'autres mutations initiatrices ont également été rapportées par Landau *et al.* [2013] dans divers gènes impliqués dans l'oncogenèse (*NRAS*, *KRAS*, *BCOR*, *EGR2*, *MED12*, *RIPK*), l'inflammation (*SAMHD1*, *ITPK*), les modifications de la chromatine (*HIST1H1E*, *ZMYM3*, *CHD2*) ou le maintien des télomères (*POT1*).

La valeur pronostique et la fréquence exacte de ces mutations reste à évaluer.

Conclusion : Les anomalies génomiques sont multiples et diversement associées entre elles au cours de la LLC. Il existe parfois un schéma d'association préférentielle entre une mutation et une anomalie chromosomique spécifique. Ces anomalies sont dans certains cas responsables de la transformation maligne des cellules, alors que d'autres sont impliquées dans la progression. Ces désordres génomiques influencent clairement la présentation biologique et l'évolution clinique des patients atteints de LLC ; elles constituent pour la plupart un marqueur majeur du pronostic des patients. Nous avons choisi d'étudier dans ce travail la relation entre l'existence/la nature des aberrations chromosomiques, reflet de l'instabilité génomique, et la présence d'une dysfonction télomérique.

II- OBJECTIFS

Objectif 1 : Etude de la valeur pronostique et des mécanismes moléculaires de l'expression du gène *MCL1*

Objectif 2 : Etude de la relation entre dysfonction télomérique et aberrations chromosomiques

Objectif 3 : Etude de la contribution de la technique de MLPA dans l'étude des anomalies cytogénétiques à valeur pronostique

Objectif 4 : Etude de la relation entre mutation de *TP53* et statut télomérique (*travaux en cours*)

III- RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. VALEUR PRONOSTIQUE ET MECANISMES MOLECULAIRES DE L'EXPRESSION DE *MCL1*

ARTICLE 2

L. VERONESE, O TOURNILHAC, P VERRELLE, F DAVI, G DIGHIERO, E CHAUTARD, R VEYRAT-MASSON, F KWIATKOWSKI, C GOUMY, P VAGO, P TRAVADE and A TCHIRKOV. **Low *MCL1* mRNA expression correlates with prolonged survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia.** *Leukemia*. 2008; 22(6): 1291-3

Objectif : L'objectif de notre étude était d'évaluer la valeur pronostique de l'expression du gène anti-apoptotique *MCL1* qui code un facteur de survie impliqué dans la résistance à l'apoptose des lymphocytes de LLC. Pour cela, nous avons quantifié le niveau de l'expression de *MCL1L* (isoforme anti-apoptotique) par RT-PCR quantitative en temps réel dans les lymphocytes sanguins de 115 patients atteints de LLC. Les résultats ont été corrélés aux stades de Binet, à la survie des patients et aux facteurs de pronostic de référence dont le statut mutationnel des IgV_H.

Résultats : Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le niveau de l'expression de *MCL1* et divers marqueurs du pronostic (stade selon Binet, statut mutationnel des IgV_H, temps de doublement de la lymphocytose, taux de β 2microglobuline, taux de thymidine kinase, expression de CD38 et expression de *hTERT*). L'expression de l'ARNm de *MCL1* est significativement corrélée à l'expression de la protéine MCL1 étudiée par cytométrie en flux. Les patients exprimant fortement *MCL1* ($MCL1 \geq 55$) ont une survie significativement plus courte que les patients exprimant faiblement *MCL1* ($MCL1 < 55$) aussi bien parmi les patients tous stades confondus ($p=0,00092$ que parmi les stades A ($p=0,002$). La survie sans traitement est significativement plus courte chez les patients en stade A exprimant fortement *MCL1* ($p=0,00088$). En analyse multivariée selon le modèle de Cox (incluant le stade selon Binet et le statut IgV_H), l'expression de *MCL1* apparaît comme un facteur de pronostic indépendant de la survie globale ($p=0,0093$).

Conclusion : L'étude de l'expression de *MCL1* permet d'identifier précocement les formes de LLC à haut risque et faible risque d'évolution défavorable et constitue à ce titre un marqueur du pronostic.

LETTER TO THE EDITOR

Low *MCL-1* mRNA expression correlates with prolonged survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia

Leukemia advance online publication, 29 November 2007;
 doi:10.1038/sj.leu.2405052

B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is a heterogeneous malignant disease that involves deregulated apoptosis. Over-expression of anti-apoptotic proteins of the *BCL-2* (B-cell lymphoma gene-2) family such as *BCL-2* and *MCL-1* (myeloid cell leukemia-1) is commonly detected in B-CLL. Higher levels of *MCL-1* have been correlated with a poor treatment response.¹ *MCL-1* gene silencing by RNA interference was reported to induce apoptosis in B-CLL cells, suggesting that the *MCL-1* gene might be a therapeutic target.² Still, the impact of different *MCL-1* gene expression levels on the prognosis of B-CLL patients remains unknown.

To address this issue, we quantified the expression of *MCL-1* gene in 119 B-CLL patients and correlated the results with patient survival and known prognostic markers.

This study was retrospective. Seventy-nine men and 40 women (median age of 62 years) were diagnosed with B-CLL between January 1980 and March 2006 at the Clermont-Ferrand Hospital, Pasteur Institute and Pitié-Salpêtrière Hospital (France). Peripheral blood samples were obtained after informed consent. Mononuclear cells were isolated and cryopreserved. At the time of sampling, 69 patients were in Binet stage A, 31 in Binet stage B and 19 in Binet stage C. The median interval from diagnosis to sampling was 2 months. Treatment decisions and modalities in all centers were based on the French Cooperative Group guidelines. Stage A patients remained untreated until disease progression. Of note, all samples from stage A patients were obtained before any therapy. Stage B/C patients received early treatment, mainly chlorambucil or fludarabine as a first-line therapy. Median follow-up for the whole population was 9 years.

The amount of the full-length *MCL-1* transcript encoding the anti-apoptotic isoform of MCL-1 protein (MCL-1L) was assessed using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR (RQ-PCR) and normalized for β -glucuronidase (*GUS*) gene expression, using previously reported primers.^{3,4} The median percentage of tumor lymphocytes in patient samples was 74% (37–99%, range) as assessed with immunophenotype analysis ($n=69$). Residual normal cells did not significantly affect the determination of *MCL-1* mRNA, since there was no difference in *MCL-1* levels between the samples with >74% tumor purity and those with <74% purity (Kruskal–Wallis test, $P=0.41$, NS). In 18 samples, we quantified MCL-1 protein expression using flow cytometry and found that the mRNA and protein levels were significantly correlated (Figure 1), suggesting that the amount of *MCL-1* mRNA was predictive of the MCL-1 protein expression.

The *MCL-1*/*GUS* ratio was highly variable within a range of 10–776, with a median value of 85. We scored the relative level of *MCL-1* mRNA as low (first tertile, <55), intermediate (second tertile, 55–133) and high (third tertile, >133) and compared the survival in these groups. The survival times were not different in patients with intermediate and high *MCL-1* expression (log-rank test, $P=0.78$). However, patients expressing *MCL-1* at intermediate/high levels (≥ 55) have significantly shorter survival than patients expressing *MCL-1* at low levels (<55). This relationship was significant within the whole patient population ($P=0.00092$; Figure 2a) and among stage A patients ($P=0.002$; Figure 2b). Moreover, the time to first therapy was significantly shorter in previously untreated stage A patients with intermediate/high levels of *MCL-1* mRNA compared with those with low levels of *MCL-1* mRNA ($P=0.00088$; Figure 2c).

In a multivariate Cox analysis with the major prognostic indicators of B-CLL,⁵ Binet stage ($P=0.013$) and immunoglobulin V gene (IgV) mutational status ($P=0.0014$), *MCL-1* mRNA expression was an independent, significant predictor of overall

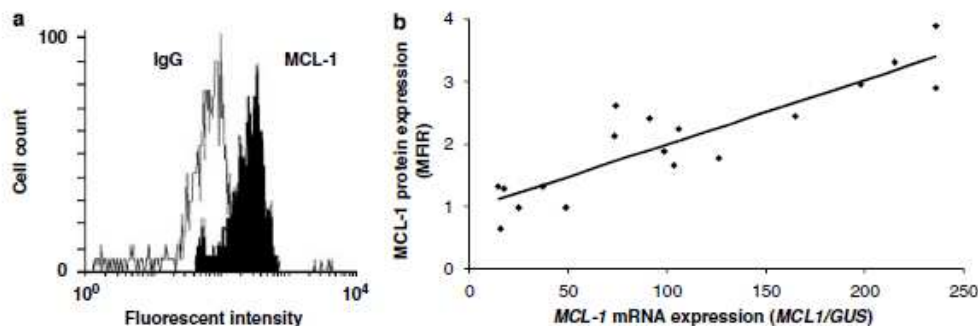


Figure 1 (a) The lymphocyte population from B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) samples was examined for the myeloid cell leukemia-1 (MCL-1) protein expression by intracellular staining and flow cytometry. Cells were incubated with the MCL-1L antibody and control IgG antibody, and MCL-1 and IgG were quantified by the mean fluorescence intensity (MFI). The MCL-1 value was normalized by dividing the MCL-1 value by the control IgG value, obtaining the MFI ratio (MFI ratio) for each sample. The graph demonstrates the MCL-1 and control IgG staining patterns in a B-CLL sample (MFI ratio of 3.9). (b) Correlation between MCL-1 mRNA and MCL-1 protein expression levels in primary B-CLL cells. The MCL-1 mRNA level was measured using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR and expressed as an *MCL-1*/*GUS* ratio multiplied by 100.

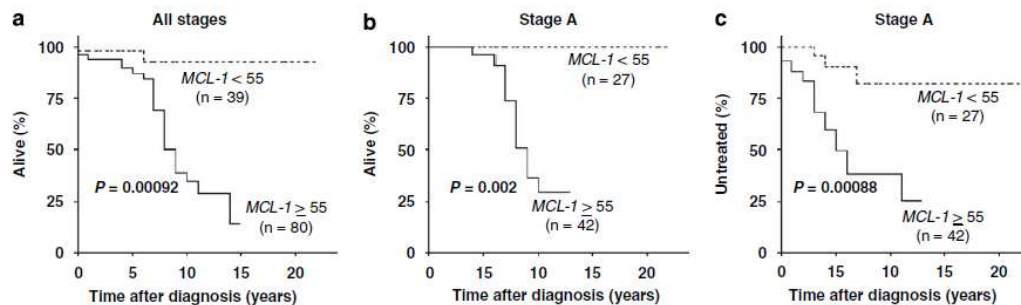


Figure 2 Overall survival in the whole B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) patient population (a), in stage A patients (b) and treatment-free survival in stage A patients (c) as a function of myeloid cell leukemia-1 (*MCL-1*) mRNA expression. Patients expressing *MCL-1* at low levels (<55) have significantly longer overall and treatment-free survival when compared with those expressing *MCL-1* at intermediate/high levels (≥55).

survival ($P=0.0093$). The hazard ratio for higher *MCL-1* expression (≥55) was 7.0 (95% confidence interval 1.6–30.6).

In addition, *MCL-1* mRNA levels did not correlate with clinical stage and known biological prognostic markers of B-CLL⁵ such as IgV mutational status ($n=87$), CD38 expression ($n=69$), serum thymidine kinase ($n=62$) and $\beta 2$ -microglobulin ($n=63$) levels, lymphocyte doubling time ($n=64$) and human telomerase reverse-transcriptase mRNA expression ($n=113$) (data not shown).

We also determined the levels of *BCL-2* gene expression using RQ-PCR⁶ in the whole B-CLL cohort. The *BCL-2/GUS* ratio varied between 15 and 1780 with a median of 385. The level of *BCL-2* expression was on average fivefold higher than the level of *MCL-1* mRNA (Kruskal–Wallis test, $P<10^{-7}$). The expression of *BCL-2* was less variable (82%, coefficient of variation) than the expression of *MCL-1* (105%, coefficient of variation). Of note, the levels of *BCL-2* and *MCL-1* transcripts were significantly correlated (Spearman's rank test, $r=0.42$, $P=0.00016$). To assess the relative prognostic importance of *BCL-2* and *MCL-1* transcript levels, we included these two parameters in a Cox model for overall survival. *MCL-1* ($P=0.0092$) but not *BCL-2* gene expression ($P=0.52$) had a significant impact on prognosis. In a previous study, *BCL-2* mRNA was found to be overexpressed in most of the B-CLL samples and alone was not predictive of patient outcome.⁷

The current study shows that the level of *MCL-1* mRNA expression may be an independent prognostic marker in B-CLL, which is not correlated to traditional indicators of prognosis such as IgV gene mutation profile. In particular, a low *MCL-1* gene expression identifies stage A patients with indolent and stable disease and a longer time interval between diagnosis and need of therapy. Lower levels of *MCL-1* protein expression have been previously correlated with the ability of patients with B-CLL to achieve a complete remission after treatment.¹ Of note, our data suggest that the *MCL-1* mRNA and protein levels in B-CLL are correlated. Taken together, these observations show that low *MCL-1* expression levels characterize B-CLL patients with a low risk of disease progression who also are likely to respond to treatment, which may be useful for the therapeutic management of cases with early B-CLL.

In the future prospective studies, it would be important to validate these results and explore if the *MCL-1* transcript level is predictive of a treatment response. It would also be essential to investigate in individual patients whether the *MCL-1* expression level remains stable during the course of the disease or increases during progression or development of drug resistance.

The prognostic role of *MCL-1* gene expression further implicates this pro-survival molecule in the pathogenesis of B-CLL. Given that most B-CLL cells contain high levels of BCL-2, it was suggested that the combination of *MCL-1* and BCL-2 might provide a superior protection against apoptosis.⁸ Of note, BCL-2 and *MCL-1* can inhibit apoptosis by sequestering pro-death proteins. Del Gaizo Moore *et al.*⁸ have recently observed that in B-CLL cells almost all pro-apoptotic BIM appeared to be present in complex with BCL-2. They suggested that in B-CLL cells with abundant BCL-2, this protein is so highly occupied by BIM molecules that the cells have very poor anti-apoptotic reserve, which may potentially explain the notable chemosensitivity of B-CLL. Upregulation of the *MCL-1* gene might provide additional survival capacities to B-CLL cells during physiological stress or drug treatment.

Specific downregulation of *MCL-1* gene expression by short interfering RNA has been recently shown to reduce the *MCL-1* protein level and promote apoptosis and death of primary B-CLL cells.² In this regard, our finding that low *MCL-1* gene expression is related to a good prognosis may be relevant, supporting *MCL-1* as a potential therapeutic target. However, it should be noted that the downregulation of *MCL-1* influences only some of the death pathways and eliminates only a proportion of B-CLL cells. Targeting *MCL-1* expression in B-CLL could be effective in combination with other antitumor agents such as rituximab.²

L Véronèse^{1,2}, O Toumilhac³, P Verrelle^{2,4}, F Davi⁵, G Dighiero⁶, E Chautard², R Veyrat-Masson⁷, F Kwiatkowski⁸, C Goumy¹, P Vago¹, P Travade³ and A Tchirkov^{1,2,4}

¹Université Clermont 1, UFR Médecine, CHU Clermont-Ferrand, Service de Cytogénétique Médicale, Clermont-Ferrand, France;

²EA 3846, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France;

³Service d'Hématologie Clinique, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France;

⁴Département de Radiothérapie, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France;

⁵Service d'Hématologie Biologique & Université Pierre et Marie Curie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France;

⁶Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay;

⁷Service d'Hématologie Biologique, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France and

⁸Service Statistiques et Communications Médicales, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France

E-mail: andrei.tchirkov@cjp.fr

ARTICLE 3

L VERONESE, O TOURNILHAC, P VERRELLE, F DAVI, G DIGHIERO, E CHAUTARD, R VEYRAT-MASSON, F KWIATKOWSKI, C GOUMY, L GOUAS, JO BAY, P VAGO A TCHIRKOV. **Strong correlation between VEGF and MCL1 mRNA expression levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia.** *Leukemia Research.* 2009; 33: 1623–1626

Introduction : Nous avons démontré que la dysrégulation du gène anti-apoptotique *MCL1* joue un rôle essentiel dans la pathogénèse de la LLC. Les cytokines multifactorielles VEGF et IL6 interviennent dans la régulation positive de *MCL1* selon un mode autocrine. Nous proposons d'étudier de manière rétrospective l'expression de ces gènes dans un double but : rechercher d'éventuelles corrélations entre l'expression de *VEGF* et le pronostic et préciser les mécanismes moléculaires de la régulation de *MCL1* dans les lymphocytes de LLC. Pour cela, nous avons quantifié le niveau d'expression de *VEGF* et d'*IL6* par qRT-PCR dans une série de 88 patients atteints de LLC. Les résultats ont été corrélés au niveau d'expression de l'ARNm de *MCL1*, à la survie des patients et aux facteurs de pronostic de référence dont le stade de Binet et le statut mutationnel des IgV_H.

Résultats : Le niveau d'expression de *MCL1* est fortement et très significativement corrélé à celui de *VEGF* chez tous les patients ($p < 10^{-7}$). L'expression de *VEGF* n'est pas corrélée au stade selon Binet ; le taux de transcrit *VEGF* est par contre plus élevé chez les patients non mutés pour les IgV_H ($p = 0,016$). Une expression forte de *VEGF* ($VEGF \geq 19,4$) est associée à une survie globale raccourcie chez les patients tous stades confondus ($p = 0,019$). Cependant, en analyse multivariée incluant *MCL1*, *VEGF* et statut IgV_H, l'expression de *VEGF* n'est plus prédictive de la survie du fait de la corrélation étroite entre les niveaux de transcrits *VEGF* et *MCL1* et de la forte valeur pronostique de l'expression de *MCL1*.

L'expression d'*IL6* est significativement plus forte chez les patients en stade A ($p = 0,033$) et parmi les patients mutés pour les IgV_H ($p = 0,024$). Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre expression d'*IL6* et survie, ou entre expressions d'*IL6* et *MCL1*.

Conclusion : L'expression de *VEGF* ne constitue par un nouveau facteur de pronostic dans la LLC ; par contre, l'expression de *MCL1* est fortement corrélée à l'expression de *VEGF*, confirmant le rôle de cette voie de signalisation dans la survie des lymphocytes tumoraux et suggérant que VEGF pourrait réguler positivement MCL1 selon un mode autocrine. L'inhibition de *VEGF* ou de ses voies de signalisation pourrait constituer une approche thérapeutique dans la LLC.



Strong correlation between *VEGF* and *MCL-1* mRNA expression levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia

Lauren Véronèse^{a,b,c,d}, Olivier Tournilhac^{c,d}, Pierre Verrelle^{c,e}, Frédéric Davi^f, Guillaume Dighiero^g, Emmanuel Chautard^c, Richard Veyrat-Masson^{c,h}, Fabrice Kwiatkowskiⁱ, Carole Goumy^{a,b}, Laetitia Gouas^{a,b}, Jacques-Olivier Bay^{c,d}, Philippe Vago^{a,b}, Andrei Tchirkov^{a,b,c,e,*}

^a Univ Clermont 1, Fac Médecine, Histologie Embryologie Cytogénétique, Clermont-Ferrand F-63001, France

^b CHU Clermont-Ferrand, Cytogénétique Médicale, Clermont-Ferrand F-63003, France

^c Univ Clermont 1, Fac Médecine, EA 3846, Clermont-Ferrand F-63011, France

^d Service d'Hématologie Clinique Adulte, CHU, Clermont-Ferrand F-63003, France

^e Département de Radiothérapie, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand F-63011, France

^f Service d'Hématologie Biologique & Université Pierre et Marie Curie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris F-75013, France

^g Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo 11400, Uruguay

^h Service d'Hématologie Biologique, CHU, Clermont-Ferrand F-63003, France

ⁱ Service Statistiques et Communications Médicales, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand F-63011, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2009

Received in revised form 30 April 2009

Accepted 4 May 2009

Available online 31 May 2009

Keywords:

B-CLL

Gene expression

VEGF

IL-6

MCL-1

Prognosis

ABSTRACT

Expression of the anti-apoptotic myeloid cell leukemia-1 (*MCL-1*) gene is a novel prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). Vascular and endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-6 (IL-6) are able to upregulate *MCL-1* via autocrine signaling loops. In 88 B-CLL patients, we found a strong correlation of *MCL-1* gene expression with *VEGF* ($P < 10^{-7}$) but not with *IL-6* mRNA levels. *VEGF* but not *IL-6* expression influenced patient prognosis. *VEGF* may be a positive autocrine *in vivo* regulator of *MCL-1* in B-CLL. Inhibition of VEGF and its signaling may prove to be useful in the treatment of B-CLL patients.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Recent clinical studies have demonstrated an important prognostic role for expression of the anti-apoptotic myeloid cell leukemia-1 (*MCL-1*) gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) [1,2]. B-CLL patients expressing high levels of *MCL-1* mRNA and protein have shorter overall survival than patients with low expression levels [1,2]. In addition, specific down-regulation of *MCL-1* gene expression was found to promote apoptosis and death of primary B-CLL cells, suggesting the possibility of anti-MCL-1

therapy [3]. In this context, it seems to be essential to investigate molecular mechanisms responsible for the overexpression of *MCL-1* gene in B-CLL.

Vascular and endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-6 (IL-6) are multifunctional cytokines known to stimulate *MCL-1* gene expression in lymphoproliferative disorders and solid tumors [4–8]. The results of *in vitro* experiments suggested that these cytokines may upregulate *MCL-1* via autocrine signaling loops [5–9], which was demonstrated in particular for VEGF in cultured malignant B-cells [5,6,9]. So far, a possible activation of such mechanisms in B-CLL has not been investigated *in vivo*. Correlated expression of *MCL-1* and *VEGF* and/or *MCL-1* and *IL-6* genes at the mRNA level in cells from patients with B-CLL would provide evidence supporting the autocrine cytokine-dependent mechanism regulating the *MCL-1* gene. The expression of these cytokine genes may also play a role in B-CLL prognosis. To address these issues, we quantified the levels of *VEGF* and *IL-6* mRNA and tested correlations between the expres-

* Corresponding author at: Service de Cytogénétique Médicale, CHU, UFR Médecine, Place Henri Dunant - BP 38, 63001 Clermont-Ferrand Cedex 1, France. Tel.: +33 4 73 17 81 10; fax: +33 4 73 26 91 82.

E-mail addresses: andrei.tchirkov@cjp.fr, atichirkov@chu-clermontferrand.fr (A. Tchirkov).

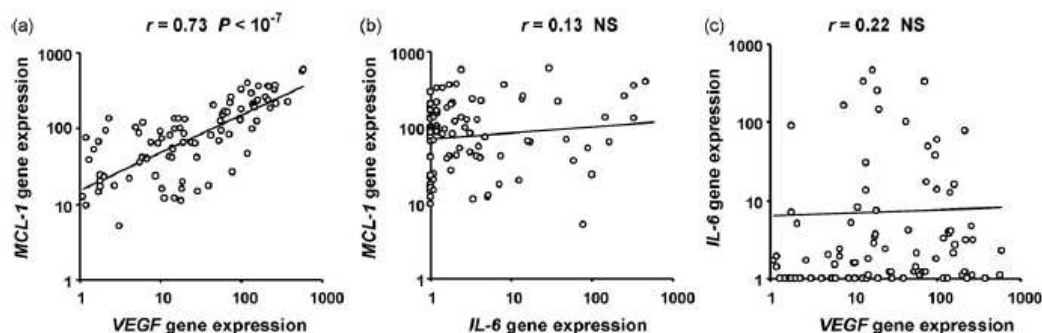


Fig. 1. The amount of *MCL-1* gene transcripts in B-CLL cells was strongly correlated with the level of *VEGF* gene expression (a), whereas no correlation was found between *IL-6* and *MCL-1* expression (b). The levels of *VEGF* and *IL-6* mRNA were not correlated (c).

sion of these genes and level of the anti-apoptotic *MCL-1* transcript in 88 B-CLL patients. We also assessed the clinical impact of *VEGF* and *IL-6* gene expression levels in this patient cohort.

2. Materials and methods

2.1. Patients and samples

This retrospective study included 88 patients (59 men and 29 women, mean age of 60 years) who were diagnosed with B-CLL between January 1980 and March 2006 at the Clermont-Ferrand Hospital, Pasteur Institute and Pitié-Salpêtrière Hospital (France). Peripheral blood samples were obtained after informed consent. Mononuclear cells (MNC) were isolated from the whole blood by means of a standard ficoll procedure and cryopreserved until RNA extraction. The mean percentage of tumor lymphocytes in the MNC samples was $77 \pm 15\%$ (SD). At the time of sampling, 49 patients were in Binet stage A, 25 in stage B and 14 in stage C. In 67 out of 88 cases (76%) the samples were obtained at diagnosis. Treatment decisions and modalities in all centers were based on the French Cooperative Group guidelines. Median follow-up was 9.5 years.

2.2. Real-time quantitative reverse transcriptase-PCR (RQ-PCR)

The amounts of *VEGF* and *IL-6* transcripts were assessed using RQ-PCR and normalized for beta-glucuronidase (*GUS*) gene expression, using previously reported primers [10–12]. The full-length *MCL-1* transcript encoding the anti-apoptotic isoform of *MCL-1* protein (*MCL-1L*) was quantified as described elsewhere [1]. The results were expressed as the ratio between transcript numbers of the target and control gene multiplied by 100. All PCR experiments were performed in triplicate. In addition, all the samples included in the study had *GUS* values within the reference range observed in routine conditions on fresh samples [10].

2.3. Analysis of immunoglobulin V gene (IgV) mutational status and immunophenotyping

Patient cDNA samples ($n = 80$) were amplified using primers for the V_H gene, cloned and sequenced as previously reported [13]. Homology of $\geq 98\%$ to the germ line sequence was used to define the absence of IgV mutations. Immunophenotypic analysis ($n = 69$) was performed on fresh blood samples or cryopreserved cells to measure the percentage of CD38⁺ cells in the CD19⁺/CD5⁺ fraction using the same approach in the three centers participating in the study [14]. Samples with $\geq 30\%$ of CD38⁺ cells were considered as CD38 positive.

2.4. Statistical analysis

The Kruskal–Wallis test, Spearman's rank correlation test (in samples from a non-normally distributed population) and linear regression analysis were used to study the relationship between characteristics. Overall patient survival was calculated using the Kaplan–Meier method and survival curves were compared using the log-rank test. Univariate and multivariate analyses were performed using the Cox regression model.

3. Results

In MNC samples from 88 B-CLL patients, *VEGF* and *MCL-1* expression levels assessed with RQ-PCR were positively and very significantly correlated (linear regression analysis, $r = 0.73$, $P < 10^{-7}$; Fig. 1a). No significant relationship was found between *IL-6* and *MCL-1* or between *VEGF* and *IL-6* expression in this patient cohort (Spearman's rank correlation, NS, Fig. 1b and c). Correlated expression of *VEGF* and *MCL-1* mRNA in malignant B-CLL lymphocytes may implicate *VEGF* as an autocrine regulator of *MCL-1*.

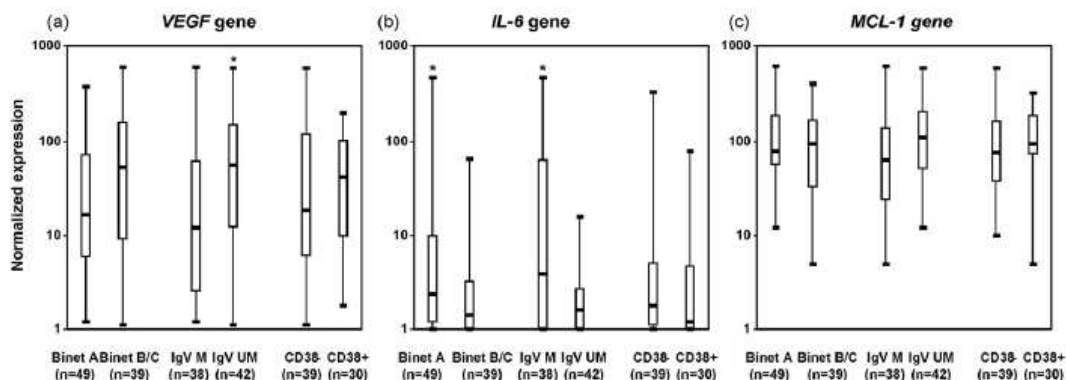


Fig. 2. Box plots (minimum, lower quartile, median, upper quartile and maximum) showing the levels of *VEGF* (a), *IL-6* (b) and *MCL-1* (c) mRNA in B-CLL patients divided in two subgroups according to Binet stages (A vs B/C), IgV mutation profile (mutated, M vs unmutated, UM) and CD38 expression (CD38[−] vs CD38⁺). Statistically significant differences are indicated by asterisks.

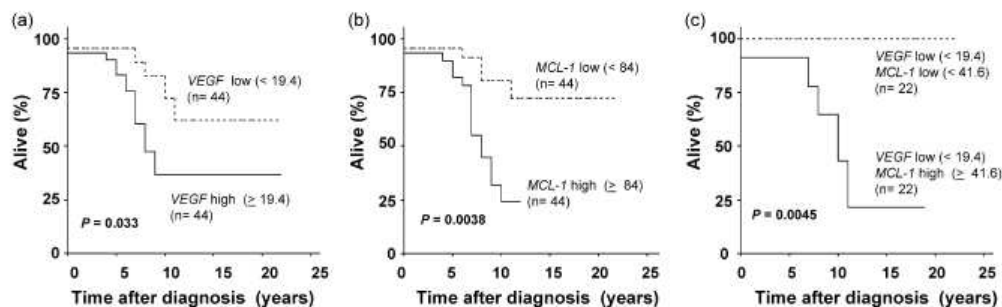


Fig. 3. Kaplan-Meier curves showing survival for B-CLL patients with low and high VEGF (a) and MCL-1 (b) gene expression levels. Kaplan-Meier curves assessing the impact of MCL-1 expression level on survival of patients with a low VEGF gene expression (c). High MCL-1 transcript levels (above median MCL-1 value in this patient population) were significantly associated with shorter survival.

To evaluate the clinical impact of VEGF and IL-6 gene expression, we first compared their levels with well-established prognostic markers of B-CLL such as Binet stage, IgV mutation status and CD38 expression (Fig. 2a and b). VEGF expression did not correlate with disease stage, but transcript numbers were higher in cases showing IgV unmutated profile associated with worse prognosis (Kruskal–Wallis test, $P=0.016$). IL-6 expression was significantly higher in the early B-CLL subgroup (Binet stage A, $P=0.033$) and in good-prognosis IgV mutated cases ($P=0.024$). No association was found between the VEGF and IL-6 gene expression and CD38 positivity. In addition, MCL-1 gene expression was not related to any of these established prognostic factors (Fig. 2c).

The number of VEGF transcripts, used as a continuous variable in univariate Cox model, was a significant predictor of overall survival ($P=0.029$). Overall survival times were then compared between the B-CLL groups with low (below median) and high (above median) VEGF expression. Fig. 3a shows that survival times were longer in patients with low VEGF levels and shorter in patients with high VEGF levels (log-rank test, $P=0.033$), which supported the prognostic role of VEGF. IL-6 expression levels were not predictive of survival in univariate Cox model ($P=0.52$, NS).

As expected, the level of MCL-1 gene expression had significant impact on the survival of B-CLL patients as a continuous variable in univariate Cox model ($P=0.0015$) and in log-rank test, using the median value of the whole population (84.0) as a cut-off point (Fig. 3b, $P=0.0038$). Residual analysis of the linear regression between VEGF and MCL-1 transcript levels revealed an abnormal population with low VEGF but high MCL-1 expression. As higher MCL-1 mRNA levels were associated with worse prognosis, we stratified 44 patients with low VEGF according to the median MCL-1 level in this group (41.6) and compared survival times between the subgroups. Patients with low VEGF but high MCL-1 expression had shorter survival than patients expressing both genes at low levels ($P=0.0045$, Fig. 3c), indicating that the prognostic impact of MCL-1 level may overwhelm the prognostic value of VEGF level. In patients with high amounts of VEGF mRNA, the overall level of MCL-1 transcript was also high. In this group, MCL-1 level did not influence the impact of VEGF on patient survival (data not shown). Of note, Binet A and B/C stages were equally distributed among different patient groups and subgroups analyzed here.

In a bivariate Cox analysis with the IgV mutational status, the strongest biological indicator of B-CLL prognosis, the level of VEGF expression was a significant prognostic factor ($P=0.018$) with the hazard ratio of 3.2 (95%CI 1.2–8.4). In a multivariate Cox analysis, including IgV mutational status ($P=0.0061$), and MCL-1 ($P=0.029$), the level of VEGF expression was no longer predictive of survival, which may be explained by a tight correlation between VEGF and MCL-1 transcript numbers and a stronger prognostic value of MCL-1 expression.

4. Discussion

MCL-1 mRNA and protein expression, leading to enhanced survival of tumor cells, has emerged as a novel molecular prognostic factor in B-CLL patients [1,2]. In a longitudinal patient analysis, the expression of the MCL-1 gene product in B-CLL cells was found to be remarkably constant over time [2]. These stable expression levels may be maintained by cytokines, which are constitutively produced by malignant lymphocytes and may function in autocrine pathways regulating the MCL-1 gene. In the present study, we explored the correlation of VEGF and IL-6 mRNA levels in leukemic cells with the amount of MCL-1 mRNA and evaluated a potential clinical significance of the expression of these cytokine genes in 88 B-CLL patients.

In B-CLL samples, we found a strong correlation between VEGF and MCL-1 mRNA levels, providing evidence that VEGF may be a positive autocrine *in vivo* regulator of MCL-1. The coefficient of determination (r^2) indicates that different VEGF transcript levels could explain 53% of the variability in MCL-1 expression. These results are in line with previous experimental studies regarding the involvement of VEGF in the regulation of MCL-1 expression in B-CLL [5,6,9]. VEGF was shown to upregulate MCL-1 mRNA and protein in B-CLL cells and to increase cell survival [5]. Co-expression of VEGF and its receptors [15,16] by B-CLL cells suggested the possibility of an autocrine survival loop. Pepper et al. [9] demonstrated in purified cell-sorted B-CLL cultures that the pro-survival effect of autocrine VEGF was neutralized by an intracellular inhibitor of VEGF receptor signaling, whereas an extracellularly acting anti-VEGF antibody could not block this effect. Thus, B-CLL cells appeared to utilize an internal autocrine VEGF survival loop. The inhibition of VEGF receptor signaling in B-CLL cells was found to result in the down-regulation of MCL-1 and induction of apoptosis in other studies [5,6].

VEGF gene expression appears to be clinically relevant in B-CLL. In our study, the level of VEGF mRNA was significantly higher in the aggressive disease form with unmutated IgV gene profile. Further analysis indicated that, independently of their IgV mutational status, B-CLL patients with high VEGF levels had shortened survival. Nevertheless, VEGF prognostic value was not independent of the MCL-1 expression level. A multivariate Cox model was in favor of MCL-1, suggesting that this gene is a stronger predictor of survival than VEGF. The impact of MCL-1 was seen particularly in cases with low VEGF levels that overexpressed the MCL-1 gene and had an adverse prognosis.

The cases with discordant VEGF and MCL-1 expression outline the role of other mechanisms regulating MCL-1 in B-CLL. In particular, sustained signaling through B-cell receptor has been associated with prolonged activation of serine/threonine kinase AKT [17],

2. TELOMERES ET INSTABILITE GENOMIQUE

ARTICLE 4

L. VERONESE, O. TOURNILHAC, M. CALLANAN, N. PRIE, F. KWIATKOWSKI, P. COMBES, M. CHAUVET, F. DAVI, L. GOUAS, P. VERRELLE, R. GUIEZE, P. VAGO, J.O. BAY, A. TCHIRKOV. **Telomeres and chromosomal instability in chronic lymphocytic leukemia.** *Leukemia* 2013 Feb;27(2):490-3

Introduction : Dans la LLC, la longueur des télomères et le niveau d'expression de *hTERT* constituent des facteurs de pronostic corrélés à la survie des patients. Par ailleurs, l'existence de variations dans l'expression de nombreux gènes impliqués dans le maintien des télomères suggère l'existence d'une dysfonction télomérique globale pouvant participer à la survenue d'anomalies cytogénétiques à valeur pronostique. L'objectif de notre travail est d'étudier la relation entre dysfonction télomérique et anomalies cytogénétiques, reflet de l'instabilité génomique. Nous avons réalisé dans une série de 77 patients l'étude cytogénétique (caryotype et FISH recherchant délétions 13q, 11q, 17p et trisomie 12), la mesure de la longueur des télomères (PCR quantitative en temps réel), l'étude de l'expression de *hTERT* et des membres du complexe shelterin *TRF1*, *TRF2* et *POT1* (qRT-PCR).

Résultats : Une analyse de clustering hiérarchique non supervisé combinant ou non les caractéristiques cytogénétiques et télomériques nous a permis d'établir 3 sous-groupes de patients présentant des profils cytogénétiques et télomériques distincts. Le cluster I combine une cytogénétique favorable, des télomères longs, une expression faible ou absente de *hTERT* et une expression forte des gènes du complexe shelterin. A l'inverse, les clusters II et III se caractérisent par de multiples aberrations chromosomiques (aneuploïdie dans le groupe II et anomalies de structure dans le groupe III, en particulier délétion 17p et 11q), une augmentation de l'expression de *hTERT* et une diminution de la longueur des télomères et de l'expression de *TRF1*, *TRF2* et *POT1*. Ils sont également associés aux marqueurs pronostiques péjoratifs comme le statut IgVH non muté, la positivité de CD38 et le temps de doublement de la lymphocytose inférieur à 6 mois.

Conclusion : Le raccourcissement des télomères et les modifications d'expression des gènes du complexe shelterin et de *hTERT* sont associés à l'augmentation du nombre d'anomalies chromosomiques, en particulier les anomalies cytogénétiques à valeur pronostique péjorative. Ces résultats confirment l'existence d'un lien entre statut télomérique et instabilité génomique au cours de la LLC et soulignent le rôle de la perte de *TP53* ou *ATM* dans cette dysfonction télomérique.

LETTER TO THE EDITOR

Telomeres and chromosomal instability in chronic lymphocytic leukemia

Leukemia advance online publication, 10 August 2012;
doi:10.1038/leu.2012.194

Telomeres are protective chromosomal end structures composed of G-rich nucleotide repeats and an associated protein complex termed shelterin. Because of incomplete replication, telomeric repeats are lost with every cell division, and this telomere attrition is involved in cell senescence and cancer (reviewed in Artandi and DePinho¹). Short, unprotected telomeres are erroneously fused by the DNA-repair system, which gives rise to aneuploidies or structural chromosome rearrangements through chromosome fusion-bridge-breakage cycles. Thus, telomere dysfunction can drive genomic instability during tumorigenesis.¹

In chronic lymphocytic leukemia (CLL), short telomeres have been associated with poor-prognosis cytogenetics.^{2,3} Besides telomere length, the functional state of telomeres depends on several molecular factors. Telomeres can be regenerated by telomerase and are protected from fusions by shelterin proteins. Detailed investigations assessing all together the expression of telomerase and shelterin genes, telomere length, recurrent aberrations and overall karyotype instability have not yet been reported in CLL. Here, we studied the telomere status and chromosomal aberrations in a series of CLL patients. A clustering analysis of the data identified groups with distinct cytogenetic and telomere profiles.

This prospective study included 77 patients (57 males and 20 females, median age of 67 years) diagnosed with CLL at the Clermont-Ferrand University Hospital. Blood samples were obtained after informed consent. At the time of sampling, 34 patients were in Binet stage A, 17 in stage B and 26 in stage C. Samples were obtained before any treatment in 60 (77.9%) patients. Among the remaining 17 cases, 16 received no treatment within 6 months prior to the date of sampling.

Karyotype was analyzed after immunostimulation of cell cultures with the CpG-oligonucleotide DSP30 and interleukin 2. Interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed with a panel of commercially available probes (Abbott Molecular, Rungis, France) for the detection of trisomy 12 and deletions of 13q14, 11q22.3 (ATM) and 17p13 (p53).

Telomere studies were performed on mononuclear cells (MNCs). Average telomere length was evaluated with quantitative real-time DNA PCR.² The method measures the difference between a sample and a reference normal DNA in the ratio of telomere repeat copy number to single-gene copy number (relative T/S ratio). This T/S ratio is proportional to the average telomere length assessed with a classical telomere restriction fragment analysis ($r = 0.89$; Supplementary Figure S1).

The expression of *hTERT* (human telomerase reverse transcriptase) and core members of the shelterin complex, *TRF1* and *TRF2* (telomeric repeat binding factors 1 and 2) and *POT1* (protection of telomeres 1) genes were quantified using real-time quantitative PCR.^{4,5} The normalized copy numbers (NCNs) were expressed as the ratio between transcript copy numbers of the target and control (*GUS*) genes multiplied by 100. The mean percentage of CLL cells determined in MNC samples as the CD19 + CD5 + population was

$74 \pm 19\%$ (s.d.). To evaluate the possible impact of normal cell contamination, we analyzed several samples ($n = 10$) before and after selection of CD19 + cells. The mean values of CD19 + cells were $75.6 \pm 13.9\%$ before and $98.2 \pm 2.4\%$ after selection. We did not find any statistically significant difference between the values of telomere length and gene expression obtained before and after selection (data not shown).

Unsupervised hierarchical clustering analyses on the basis of either a combination of cytogenetic and telomeric characteristics or cytogenetic and telomeric parameters alone were performed to identify subclasses with distinct chromosome aberration and telomeric profiles (Figures 1a–c). Karyotype and FISH data were qualitative. Karyotypes were characterized by the presence or absence of aneuploidies, translocations or deletions. FISH patterns were as follows: normal, del(13q), trisomy 12, del(17p) or del(11q). Single FISH aberrations were found in 48 cases and multiple aberrations in 10 cases. In nine cases, deletions of 17p or 11q were accompanied either by a del(13q) or a trisomy 12. One case showed the presence of a trisomy 12 and a del(13q). Telomere characteristics were included as quantitative values: relative T/S ratios for telomere length and NCN of *hTERT*, *TRF1*, *TRF2* and *POT1* transcripts. The differences in the incidence of chromosomal aberrations and in the values of telomere parameters across the clusters were analyzed statistically (Table 1).

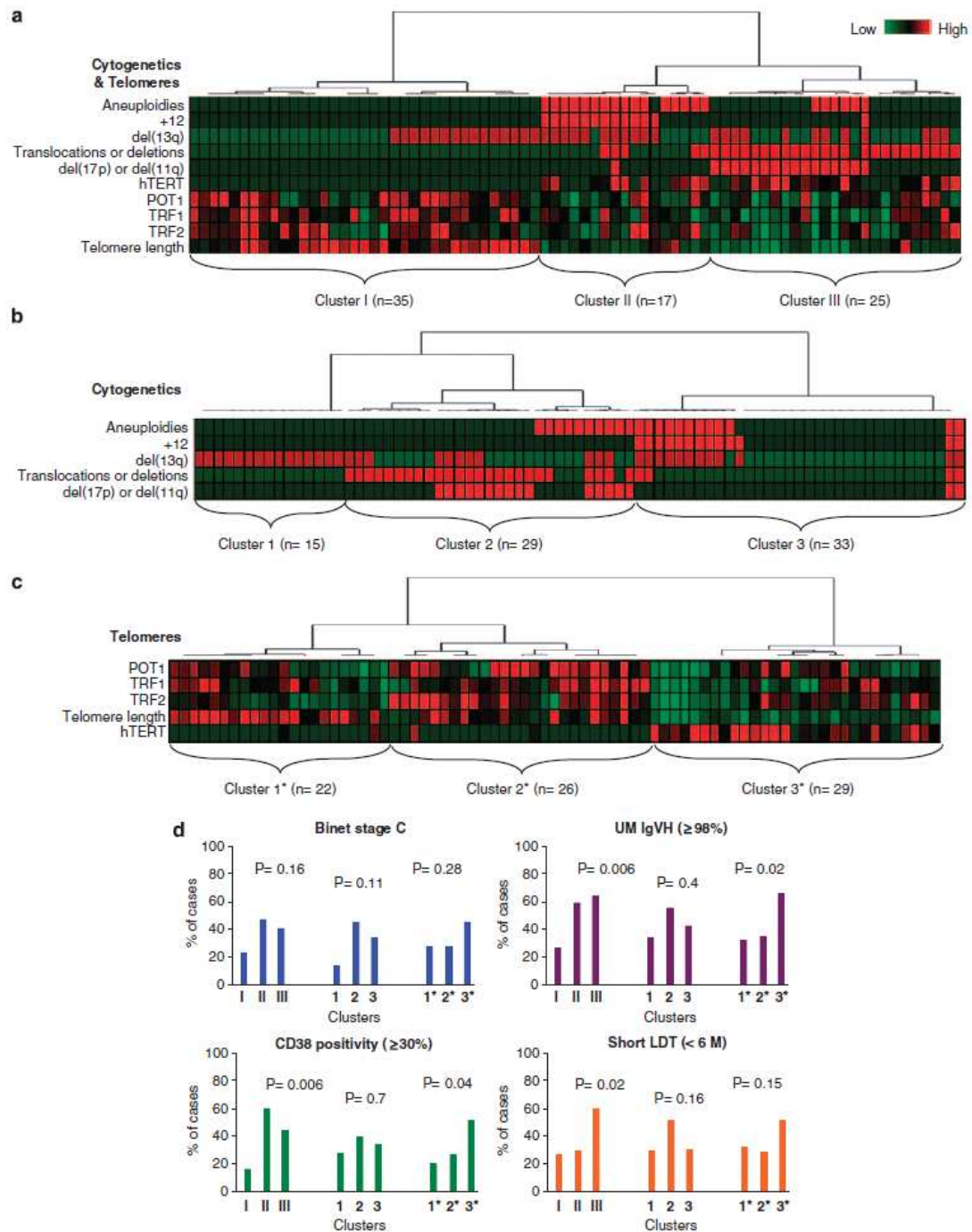
Clustering of the combined data set highlighted three groups. Cluster I demonstrated good-prognosis cytogenetics (isolated del(13q) or normal cytogenetics), long telomeres, negative or low *hTERT* and a high expression of the shelterin complex genes (*TRF1*, *TRF2* and *POT1* values were similar to those of normal B cells, data not shown). In contrast, clusters II and III displayed multiple chromosome aberrations, mostly aneuploidies in cluster II and structural chromosomal changes in cluster III. All poor-prognosis del(17p) and del(11q) cases were in cluster III, which also showed multiple karyotypic abnormalities (50% of cases) and translocations (72% of cases), the majority of translocations (86%) being unbalanced. Clusters II and III were characterized by a striking decrease in telomere length and shelterin gene-expression levels. Thus, rising chromosomal instability was associated with telomeric deficiency. The *hTERT* gene was activated in clusters II and III, consistently with its role in stabilization of rearranged tumor genomes.¹ The results also highlight the relationship of 17p and 11q deletions with more severe telomere and chromosome instability. These deletions lead to the loss of *p53* and *ATM* genes, respectively, which are involved in monitoring telomere and DNA integrity. An impact of *p53* and *ATM* deficiency on telomere length was previously reported in CLL cells.^{2,6}

Separate clustering of cytogenetic (Figure 1b) and telomeric data (Figure 1c) also showed the relationship between the telomere status and chromosomal aberrations. In particular, cytogenetic cluster 1 without any chromosomal aberration was normal in terms of telomere characteristics (Table 1). Cytogenetic cluster 2 displays structural chromosomal changes, including 17p or 11q deletions, and telomere shortening, high *hTERT* and decreased shelterin gene-expression levels. Clustering of telomere parameters alone revealed an interesting group (cluster 3*) with deficient telomeres with the highest *hTERT* level, presenting high incidences of various

aberrations, such as aneuploidies (52%), translocations or deletions (79%), del(17p) and del(11q) (55%) and a trisomy 12 (24%).

Unlike telomere length, the level of shelterin complex genes in CLL was not previously analyzed in relation to chromosomal

instability. The total expression of shelterin genes was found to be lower in clusters harboring an increased rate of aberrations (clusters III, 2 and 3*, Table 1). This reduced expression was also associated with shorter telomere length. Shelterin downregulation



may either be secondary to telomere shortening or, in contrast, may drive telomere dysfunction, thus compromising chromosomal integrity.⁷ The present data do not allow us to examine this issue, although some evidence exists. In particular, cluster 1* characterized by long telomeres and low level of chromosome aberrations contains a small subcluster with significantly decreased shelterin gene expression (seven last patients of cluster 1*, Figure 1). Interestingly, this subcluster did not harbor more chromosome aberrations than the second subcluster (first 15 patients) characterized by higher shelterin levels (data not shown). Given the small patient number, this result should be taken with caution, but it suggests that the shelterin reduction may be insufficient for the acquisition of substantial chromosomal instability when telomeres are (still) long. Follow-up studies in such patients could help to investigate if a sustained shelterin downregulation would lead to more rapid telomere erosion and/or accumulation of aberrations. In addition, interactions with other shelterin complex members could have a role in chromosomal instability. Studies of *RAP1*, *TPP1* and *TIN2* gene expression are needed to clarify the involvement of shelterin alterations in chromosomal instability in CLL.

We also evaluated well-established factors predictive of CLL progression in patients from different clusters to determine if the obtained classification may be clinically significant. Figure 1d

shows the incidence of negative prognostic features, such as Binet C stage, unmutated (UM) immunoglobulin variable region genes (IgVH), CD38 positivity ($\geq 30\%$) and short (< 6 months) lymphocyte doubling time (LDT), in different clusters. No significant relationship was found with Binet C stage. In contrast, clusters with enhanced telomere and chromosome instability showed higher incidences of classical biological factors of poor prognosis. Of note, the strongest associations with UM IgVH and CD38 positivity were found for clusters obtained by combining telomeric and cytogenetic parameters, whereas the links with telomeric clusters were weaker but still significant and, finally, the associations with cytogenetic clusters were not significant. Only the combined model showed a significant relationship with short LDT. Cytogenetics and telomeres are known to represent valuable prognostic factors in CLL,² and perhaps the combinations of both characteristics could provide a more accurate prediction of disease progression. Our study was prospective, and so far we were not able to compare survival of patients from different clusters. This issue can be addressed in a large cohort of CLL patients with adequate follow-up.

In conclusion, the identification of groups with distinct telomeric and cytogenetic profiles supports the link between telomere status and genomic instability in CLL. Telomere shortening, changes in shelterin and *hTERT* gene expression coincided

Table 1. Frequencies of chromosomal aberrations and values of quantitative telomere characteristics in different clusters

	Cytogenetics and telomeres				Cytogenetics				Telomeres			
	Cluster I, n = 35	Cluster II, n = 17	Cluster III, n = 25	P ^a	Cluster 1, n = 15	Cluster 2, n = 29	Cluster 3, n = 33	P ^a	Cluster 1*, n = 22	Cluster 2*, n = 26	Cluster 3*, n = 29	P ^a
Chromosomal aberrations												
Aneuploidies	0.0%	94.1%	24.0%	$< 10^{-6}$	0.0%	34.5%	36.4%	0.02	18.2%	11.5%	51.7%	$< 10^{-2}$
Translocations or deletions	0.0%	29.4%	96.0%	$< 10^{-6}$	0.0%	86.2%	12.1	$< 10^{-6}$	13.6%	11.5%	79.3%	$< 10^{-5}$
Del(17p) or del(11q)	0.0%	5.9%	64.0%	$< 10^{-6}$	0.0%	51.7%	6.1%	$< 10^{-4}$	0.0%	3.8%	55.2%	$< 10^{-4}$
+12	0.0%	70.6%	4.0%	$< 10^{-6}$	0.0%	0.0%	39.4%	$< 10^{-4}$	9.1%	15.4%	24.1%	0.35
Del(13q)	57.1%	35.3%	52.0%	0.33	0.0%	62.0%	63.6%	$< 10^{-3}$	50.0%	57.7%	44.8%	0.64
Telomere parameters^b												
Telomere length (T/S ratio)	1.6 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1	$< 10^{-6}$	1.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.2 ± 0.1	$< 10^{-6}$	1.6 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.6 ± 0.04	$< 10^{-6}$
<i>hTERT</i> (NCN)	4.4 ± 3.1	90 ± 23	88 ± 17	$< 10^{-5}$	0.0	96 ± 17	56 ± 9	$< 10^{-4}$	9.0 ± 4.8	9.7 ± 5.8	118 ± 16	$< 10^{-6}$
<i>TRF1</i> (NCN)	145 ± 9	97 ± 9	84 ± 9	$< 10^{-3}$	142 ± 10	83 ± 8	130 ± 10	$< 10^{-3}$	114 ± 9	145 ± 12	88 ± 8	$< 10^{-3}$
<i>TRF2</i> (NCN)	193 ± 12	183 ± 21	153 ± 16	0.11	192 ± 14	155 ± 15	192 ± 14	0.15	133 ± 8	235 ± 14	161 ± 15	$< 10^{-4}$
<i>POT1</i> (NCN)	195 ± 12	131 ± 14	132 ± 14	$< 10^{-2}$	208 ± 16	130 ± 12	165 ± 13	$< 10^{-3}$	141 ± 12	216 ± 14	125 ± 12	$< 10^{-4}$
Total shelterin ^c (NCN)	534 ± 26	413 ± 36	369 ± 31	$< 10^{-3}$	542 ± 34	369 ± 27	488 ± 31	$< 10^{-3}$	389 ± 26	596 ± 27	376 ± 27	$< 10^{-6}$

Abbreviations: *hTERT*, human telomerase reverse transcriptase; NCN, normalized copy number; *POT1*, protection of telomeres 1; *TRF*, telomeric repeat binding factor. ^aAberration frequencies were compared using the Chi-square test and quantitative telomere characteristics using the Kruskal-Wallis H-test. ^bMean values with s.e. ^cTotal shelterin gene expression (*TRF1* + *TRF2* + *POT1*).

Figure 1. (a–c) Hierarchical clustering of 77 CLL patients according to the pattern of chromosomal aberrations and telomere characteristics. Clustering was performed on the combined telomeres and cytogenetics data set (a) and separately: cytogenetics alone (b) and telomeres alone (c). Qualitative and quantitative values were normalized (centered and reduced) before clusterization. Aneuploidies, translocations or deletions, del17p or del11q, and trisomy 12 are presented in green (absence of abnormality) and red (presence of abnormality) squares. Presence of the low-risk del13q is shown in green, the absence in dark red. The different color intensities of dichotomic parameters reflect normalized values and not original binary (0/1) values. High normalized quantitative values of telomere length and expression of telomere-related genes are shown in red, intermediate values in black and lower values in green (intensity scale is shown). These normalized values, which are not logarithmic, are necessary to calculate distances between subjects and items. Distances between clusters were calculated using 1-Pearson's correlation coefficient values and the dendrogram was constructed according to Ward's algorithm. Of note, the average proportion of tumor cells in patient samples belonging to different clusters was essentially the same. For instance, the mean tumor cell content was 75% in cluster I, 75% in cluster II and 72% in cluster III (Kruskal-Wallis H-test, $P = 0.68$, not significant). (d) The proportions of cases with negative prognostic factors in different clusters. P-values were obtained with the Chi-square test showing the overall difference between the clusters.

with increasing levels of chromosome aberrations, and this was particularly affected by *p53* or *ATM* gene deletions. These CLL groups are associated with established prognostic factors and may be clinically significant.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

L Véronèse^{1,2,3}, O Tournilhac^{4,5}, M Callanan^{6,7}, N Prie^{1,2,3},
F Kwiatkowski^{1,3,8}, P Combes^{1,2,3}, M Chauvet^{6,7}, F Davi⁹,
L Gouas^{1,2,3}, P Verrelle^{5,8}, R Guièze^{4,5}, P Vago^{1,2,3,8},
JO Bay^{4,5} and A Tchirkov^{1,2,3,8}

¹CHU Clermont-Ferrand, Cytogénétique Médicale,
Clermont-Ferrand, France;

²Clermont Université, Université d'Auvergne,
Faculté de Médecine, Histologie Embryologie Cytogénétique,
Clermont-Ferrand, France;

³EA 4677 ERTICa, Université d'Auvergne,
Clermont-Ferrand, France;

⁴CHU Clermont-Ferrand, Hématologie Clinique Adulte,
Clermont-Ferrand, France;

⁵EA 7283 CREaT, Université d'Auvergne,
Clermont-Ferrand, France;

⁶Inserm U823, Institut Albert Bonniot,
Université Joseph Fourier, Grenoble, France;

⁷CHU Grenoble, Laboratoire de Génétique
Onco-hématologique, Grenoble, France;

⁸Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France and
⁹Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Pitié-Salpêtrière,
Paris, France

E-mail: atchirkov@chu-clermontferrand.fr

REFERENCES

- Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 2010; **31**: 9–18.
- Roos G, Kröber A, Grabowski P, Kienle D, Bühler A, Döhner H *et al*. Short telomeres are associated with genetic complexity, high-risk genomic aberrations, and short survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; **111**: 2246–2252.
- Brugat T, Nguyen-Khac F, Grellier A, Merle-Béral H, Delic J. Telomere dysfunction-induced foci arise with the onset of telomeric deletions and complex chromosomal aberrations in resistant chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2010; **116**: 239–249.
- Tchirkov A, Chaleteix C, Magnac C, Vasconcelos Y, Davi F, Michel A *et al*. hTERT expression and prognosis in B-chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol* 2004; **15**: 1476–1480.
- Poncet D, Belleville A, t'Kint de Roodenbeke C, Roborel de Climens A, Ben Simon E, Merle-Béral H *et al*. Changes in the expression of telomere maintenance genes suggest global telomere dysfunction in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; **111**: 2388–2391.
- Britt-Compton B, Lin TT, Ahmed G, Weston V, Jones RE, Fegan C *et al*. Extreme telomere erosion in ATM-mutated and 11q-deleted CLL patients is independent of disease stage. *Leukemia* 2012; **26**: 826–830.
- Cookson JC, Loughton CA. The levels of telomere-binding proteins in human tumours and therapeutic implications. *Eur J Cancer* 2009; **45**: 536–550.

Supplementary Information accompanies the paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

3. PLACE DE LA MLPA DANS L'ETUDE DES ANOMALIES CYTOGENETIQUES A VALEUR PRONOSTIQUE DE LA LLC

ARTICLE 5

L VERONESE, O TOURNILHAC, P COMBES, N PRIE, E PIERRE-EYMARD, R GUIEZE, R VEYRAT-MASSON, JO BAY, P VAGO, A TCHIRKOV. **Contribution of MLPA to routine diagnostic testing of recurrent genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia.** *Cancer Genetics* 2013 Jan;206(1-2):19-25. Epub 2013 Jan 10.

Introduction : La mise en évidence d'anomalies cytogénétiques récurrentes par FISH interphasique est indispensable à la prise en charge thérapeutique et à l'évaluation du pronostic de la LLC en routine. La MLPA est une technique de quantification génique qui permet d'explorer simultanément une quarantaine de locus afin de rechercher des pertes ou des gains de matériel génomique ; cette méthode peu onéreuse et à haut débit pourrait constituer une alternative à la FISH. Nous avons réalisé la technique de MLPA (principe de la MLPA : voir annexes) chez 77 patients atteints de LLC en utilisant 2 kits commerciaux (kits P037 et P038 MRC-Holland) permettant d'explorer 55 locus distincts et de rechercher entre autre les anomalies récurrentes les plus fréquentes (délétions 17p13, 11q22, 13q14 et trisomie 12). Les résultats obtenus ont été comparés aux données de FISH.

Résultats : Il existe une bonne concordance entre les 2 approches, puisque 90,9% des 77 anomalies mises en évidence par FISH sont également détectées par MLPA. Dans 7 cas, la MLPA a échoué à mettre en évidence une anomalie identifiée par FISH, le plus souvent (6 cas) en raison d'un faible nombre de cellules portant l'anomalie clonale (moins de 25%), plus rarement (1 cas) du fait de la localisation des sondes de MLPA et de la présence d'anomalies chromosomiques complexes. Dans 2 cas, la MLPA a permis d'identifier des délétions 17p13 non détectées par FISH, et dans 5 cas, des trisomies 19, mais qui se sont avérées être des faux-positifs liés soit à la présence de mutations ponctuelles dans le gène *TP53*, soit à un manque de spécificité des sondes de MLPA ciblant le chromosome 19.

Conclusion : La MLPA peut constituer une approche intéressante pour la recherche d'anomalies génomiques présentes dans une majorité de cellules malignes. Cependant, cette méthode doit être complétée par la FISH ou d'autres techniques moléculaires, en particulier dans les cas présentant un profil de MLPA normal ou atypique, afin d'éviter les faux-négatifs et les faux-positifs. En pratique, la MLPA peut constituer une approche complémentaire intéressante mais ne peut pas se substituer à la FISH.

Contribution of MLPA to routine diagnostic testing of recurrent genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia

Lauren Véronèse^{a,b,c}, Olivier Tournilhac^{d,e}, Patricia Combes^{a,c}, Nolwen Prie^{a,c},
Eléonore Pierre-Eymard^{a,c}, Romain Guïèze^{d,e}, Richard Veyrat-Masson^{e,f},
Jacques-Olivier Bay^{d,e}, Philippe Vago^{a,b,c}, Andreï Tchirkov^{a,b,c,*}

^a Clermont-Ferrand University Hospital, Department of Medical Cytogenetics, 63003 Clermont-Ferrand, France; ^b University of Auvergne, Department of Histology Embryology Cytogenetics, 63001 Clermont-Ferrand, France; ^c Research team EA 4677 ERTICA, University of Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France; ^d Centre Jean Perrin, 63011 Clermont-Ferrand, France; ^e Clermont-Ferrand University Hospital, Department of Clinical Adult Hematology – Cell Therapy, 63003 Clermont-Ferrand, France; ^f Research team EA 7283 CREaT, University of Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France; [†] Clermont-Ferrand University Hospital, Laboratory of Hematology, 63003 Clermont-Ferrand, France

To better define the place of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in routine cytogenetic diagnosis in chronic lymphocytic leukemia (CLL), we compared MLPA and fluorescence in situ hybridization (iFISH) data obtained in 77 CLL patients. Although MLPA detected most recurrent copy number genomic aberrations (90.9%), false-negative results were found in cases with small-size abnormal clones and false-positive MLPA findings resulting from point mutations (*TP53*) or an apparent lack of probe specificity (chromosome 19) were observed. Thus, MLPA may be a useful complementary but not alternative approach for iFISH testing of genomic aberration in CLL.

Keywords CLL, recurrent genomic aberrations, interphase FISH, MLPA

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

The clinical course of chronic lymphocytic leukemia (CLL) varies from indolent forms to aggressive disease rapidly leading to patient death. Cytogenetic analysis of CLL cells can provide information on individual patient prognosis (1). Chromosomal abnormalities are found in up to 85% of CLL patients (2). The main recurrent aberrations include a good-prognosis 13q14 deletion (50–60%), a trisomy 12 (15–25%) associated with intermediate prognosis and poor prognosis 11q22 (*ATM*) (10–20%), and 17p13 (*TP53*) (5–10%) deletions. Less-frequent genomic aberrations include 6q24–25, 9p2.1 and 10q23 deletions; 2p24, 8q24, and 18q21 gains; a trisomy 19; and various translocations, all of them being associated with an unfavorable prognosis (3–9).

Conventional karyotyping allows the global screening of all types of chromosomal aberrations, but this analysis is hampered by low mitotic potential of cultured tumor lymphocytes, even after

stimulation with specific mitogens. For this reason, interphase fluorescence in situ hybridization (iFISH) has become a method of choice to detect deletions of 13q14, 17p13, and 11q22 as well as trisomy 12 (2,10); however, iFISH testing has to be performed separately with specific probes for each genomic abnormality, making this approach time-consuming and relatively expensive. Most of the clinically significant aberrations in CLL represent genomic losses and gains, and recently developed high-throughput and low-cost technologies such as MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), which explores many copy number alterations simultaneously (11), may be useful in routine cytogenetic investigations in CLL patients.

The commercially available MLPA CLL probe sets were compared with iFISH in three independent studies, which demonstrated the overall reliability of the MLPA method for the detection of recurrent aberrations (12–14); however, several issues have yet to be addressed to better define the place of MLPA in routine cytogenetic diagnostic strategies in CLL. In particular, MLPA was found to be more limited than iFISH by the proportion of aberrant cells present in a sample. Establishment of reference ranges for each individual MLPA probe (15) or pre-enrichment of leukemic cells (16) were proposed,

Received September 10, 2012; received in revised form December 3, 2012; accepted December 3, 2012.

* Corresponding author.

E-mail address: atchirkov@chu-clermontferrand.fr

2210-7762/\$ - see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cancergen.2012.12.002>

but these approaches only partly enhanced the sensitivity of MLPA. In addition, the data are insufficient regarding the risk of false-positive findings with MLPA screening of the main recurrent aberrations. Furthermore, MLPA can detect genomic alterations in regions not covered with the standard iFISH probe panel, but the validity of this detection was not always investigated. In the present study, we compared MLPA and iFISH data obtained in 77 CLL patients, with particular attention paid to the analysis of discordant results.

Materials and methods

Patients and samples

This study included 77 patients (52 male and 25 female) with CLL diagnosed according to standard criteria. Median age at the time of sampling was 70 years (range, 39–88). According to the Binet classification, 36 patients were in stage A, 18 in stage B, and 23 in stage C. The median lymphocyte count was 58 G/L (range, 3.8–519), and the median tumor cell content in peripheral blood (PB) was 85% (range, 25–99%). PB samples were obtained from CLL patients and eight healthy controls after written informed consent was obtained, and the samples were studied in parallel using iFISH and MLPA.

Interphase FISH

Slides for iFISH and conventional cytogenetic analyses were prepared using standard methods after a 72-hour cell culture stimulated with interleukin 2 and CpG-oligonucleotides. iFISH was performed according to the manufacturer's instructions (Abbott Molecular, Rungis, France), with the use of the following probes to detect the main recurrent CLL aberrations: D13S319 (13q14.3)/D13S1020 (13q34), ATM (11q22), LSI P53 (17p13.1)/D17Z1 (CEP17), and D12Z3 (CEP12). The LSI MYC (8q24) and LSI 19q13/19p13 probes were used to confirm additional abnormalities detected by MLPA. At least 200 interphase nuclei were analyzed by two independent investigators. For comparison with MLPA data, the percentage of aberrant cells was expressed as a calculated relative copy number (RCN). The cut-off points used for aberration detection were 10% for the LSI probes, which corresponded to the RCN value of 0.95, and 5% for the centromeric probes, which corresponded to the RCN value of 1.025. Karyotype data were also available for all patients.

MLPA analysis

DNA extraction from total PB was performed with the Nucleo-spin Blood L kit according to the manufacturer's specifications (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Two specifically designed sets of 56 probes (SALSA MLPA P037-CLL and P038-CLL, MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands) for testing CLL recurrent genomic aberrations were used following the manufacturer's protocol. Briefly, the two set of probes were hybridized to 100 ng of DNA. After ligation of the adjacent hybridized hemi-probes, amplification was performed using the universal primers that were provided. Polymerase chain reaction (PCR) products were separated and quantified by capillary electrophoresis on an automatic sequencer (GenomeLab GeXP

Analysis System, Beckman-Coulter, Villepinte, France). Experiments were performed in duplicate for the P037 and P038 probe sets. Peak areas were measured using the GenomeLab GeXP analysis software and data were analyzed with the Coffalyser Software (MRC-Holland). The relative peak area was obtained for each CLL target sequence probe by dividing the peak area of this probe by the average peak areas of internal control probes located in regions not involved in CLL. The RCN value for each probe was then obtained by dividing the relative peak area by the mean of corresponding relative peak areas from healthy control samples analyzed in the same experiment. In normal diploid DNA samples, the RCN value is expected to be 1. For all probes, RCN values of healthy controls were evaluated, and the experiments were analyzed only when RCN values of all probes in healthy controls ranged between 0.85–1.15. The cut-off thresholds to detect a copy-number aberration were <0.85 for losses and >1.15 for gains. Bi-allelic deletions can result in RCN values <0.5, depending on the percentage of cells carrying the aberration.

TP53 gene sequencing

The entire *TP53* coding region (exons 2–11) as well as intron/exon boundaries were amplified and sequenced on both strands using an ABI 3100 automated fluorescent sequencer (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France). Primer sequences are available on request.

Results

Recurrent chromosomal aberrations detected by using MLPA and iFISH

Both CLL-MLPA sets contain probes for del(13)(q14), del(11)(q22), del(17)(p13), and +12. To evaluate the reliability of MLPA in the detection of these aberrations, PB

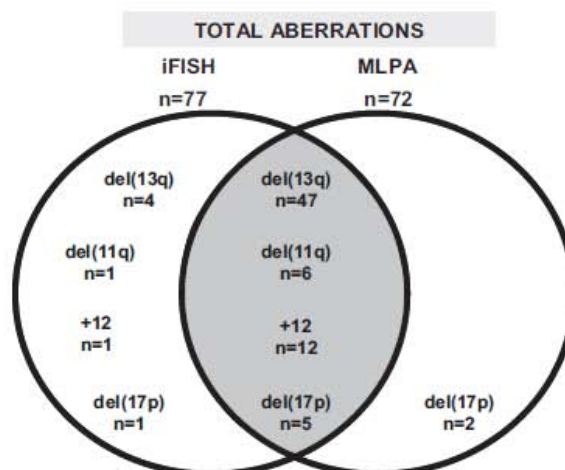


Figure 1 Comparison between iFISH and MLPA findings in CLL patients with abnormal results. 70 aberrations were detected with the two methods. MLPA missed 7 of 77 aberrations detected with iFISH. Two 17p deletions were detected with MLPA only.

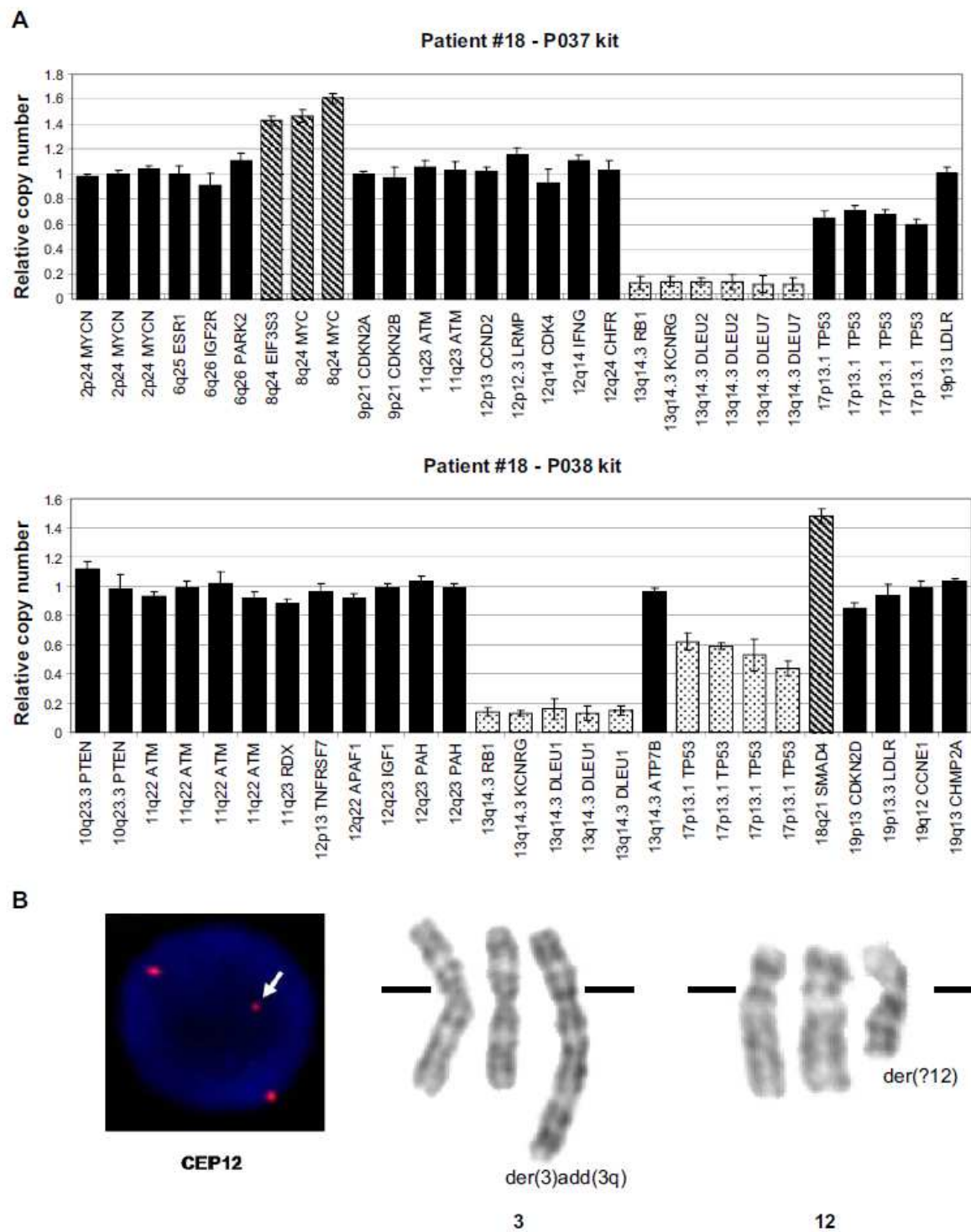


Figure 2 (A) Representative MLPA results obtained in CLL patient #18: monoallelic 17p and biallelic 13q deletions (dotted bars) and gains of 8q24 and 18q21 (hatched bars). (B) iFISH and partial karyotype images for patient #18. Interphase FISH revealed two normal signals of the CEP12 probe and a third signal of diminished intensity (white arrow). Karyotype showed the following structural rearrangements: der(3)add(3q) and a marker chromosome, which was supposed to represent a derivative chromosome 12 containing a part of the centromeric sequence. MLPA results did not show any chromosome 12 abnormality (panel A).

Table 1 Discordant results between iFISH and MLPA in the detection of the main recurrent aberrations in CLL

Patient no.	Tumor CD19+ cells (%)	iFISH (RCN)	MLPA (RCN)	Genomic region	Cause of discordant results
35	80	del(13q) (0.93)	Normal (0.96)	13q14	Small aberrant clone (14%)
68	NA	del(13q) (0.895)	Normal (1.02)	13q14	Small aberrant clone (21%)
70	90	del(13q) (0.94)	Normal (1.02)	13q14	Small aberrant clone (12%)
47	90	del(13q) (0.9)	Normal (0.95)	13q14	Small aberrant clone (20%)
74	50	del(13q) (0.70)	del(13q) (0.78)	—	—
		del(11q) (0.91)	Normal (1.01)	11q22	Small aberrant clone (18%)
26	50	del(13q) (0.78)	del(13q) (0.88)	—	—Small aberrant clone (14%)
		del(17p) (0.93)	Normal (0.90)	17p13	—
18	70	del(13q) (0.81)	del(13q) (0.14)	—	—
		del(17p) (0.68)	del(17p) (0.49)	—	—
		+12 (1.34)	Normal (0.97)	Chr. 12	MLPA probe position
34	90	Normal (0.98)	del(17p) (0.5)	17p13	TP53 mutation
69	90	del(13q) (0.58)	del(13q) (0.54)	—	—
		del(11q) (0.56)	del(11q) (0.59)	—	—
		Normal (0.97)	del(17p) (0.68)	17p13	TP53 mutation

Abbreviation: NA, not available.

samples were analyzed in parallel with MLPA and iFISH. The results are summarized in Figure 1. Among 77 CLL cases, iFISH detected 77 aberrations in 66 patients (85.7%), whereas MLPA identified 72 aberrations in 62 patients (80.5%). The results regarding the detection of single and multiple aberrations are given in Supplementary Table S1. A typical abnormal MLPA profile (patient #18) with two recurrent alterations—a monoallelic del(17)(p13) and a biallelic del(13)(q14)—is shown in Figure 2A. Overall, MLPA detected 70 of 77 (90.9%) aberrations found with the reference iFISH method. In comparison with iFISH, MLPA detection rates were 92.1% for del(13)(q14), 92.3% for trisomy 12, 85.7% for del(11)(q22), and 83.3% for del(17)(p13). In addition, two cases revealed a del(17)(p13) using MLPA but not iFISH.

Analysis of discordant results between MLPA and iFISH

Discordant cases are detailed in Table 1. Six patients represented false-negative MLPA results. In four cases, a del(13)(q14) was detected with iFISH but not with MLPA (patient #35, #68, #70, and #47). According to iFISH data, the proportion of aberrant cells in these cases varied from 12–21%, corresponding respectively to RCN values from 0.94–0.895, which were within the normal MLPA range. Similarly, MLPA did not identify one case of del(11)(q22), which can also be explained by the presence of the deletion in only 18% of cells (patient #74, RCN of 0.91). In patient #26, a del(17)(p13) was detected by iFISH only, in 14% of cells (RCN of 0.93).

In one case with multiple genomic alterations (patient #18), a trisomy 12 was detected using iFISH, whereas MLPA showed a normal chromosome 12 pattern. The discordant result was clarified by the analysis of iFISH and karyotype results (Figure 2B). iFISH showed three CEP12 probe signals in 68% of nuclei, with one of the signals being of lower intensity. G-banding analysis revealed two additional marker chromosomes. One of them represented a der(3)

add(3q), and the other was most likely a derivative chromosome 12 containing a part of the centromeric sequence. Apparently, this marker chromosome did not contain any region targeted by MLPA probes at chromosome 12p12q, and therefore escaped the detection. MLPA analysis did identify four distinct aberrations: a gain of 8q24 and deletions of 17p13 and 13q14 confirmed by iFISH, and a gain of 18q21 confirmed by cytogenetic analysis (trisomy 18).

In two patients (#34 and #69), the presence of a del(17)(p13) was indicated by MLPA, whereas the iFISH pattern was normal. Repeated MLPA analyses revealed in these cases the loss of a single TP53 probe (TP53-2 1990-L3129, kit P038 in patient #34, as illustrated in Figure 3A; TP53-4 1587-L1159, kit P038 in patient #69). The RCN values for other TP53 target sequences were within the normal range. The discordance was elucidated by TP53 sequencing, which revealed the presence of point mutations in regions targeted by MLPA probes. Patient #34 harbored a missense mutation in exon 7 (c.743G>A), which led to a mutated codon at position 248 (p.R248Q) (Figure 3B). This region corresponded to the ligation site of the hybridized MLPA hemiprobe (TP53-2 1990-L3129, kit P038, Figure 3C). Correct hybridization and ligation were most likely hampered by the mismatch, and the absence of amplification of the probes mimicked a deletion. In patient #69, a frameshift mutation was detected in exon 10 (c.1025_1060del). This 26 bp deletion changed the arginine at position 342 into an alanine and led to the apparition of 39 aberrant amino acids followed by a premature stop codon (p.R342Qfs39X). This mutation also led to a MLPA probe hybridization failure.

MLPA detected genomic aberrations not explored by the standard iFISH probe panel

In addition to probes for the main recurrent aberrations, MLPA kits contain probes targeting other genomic regions known to be altered in CLL, which are not systematically included in the iFISH probe panel. As mentioned previously, one case showed gains in 8q24 and 18q21 confirmed

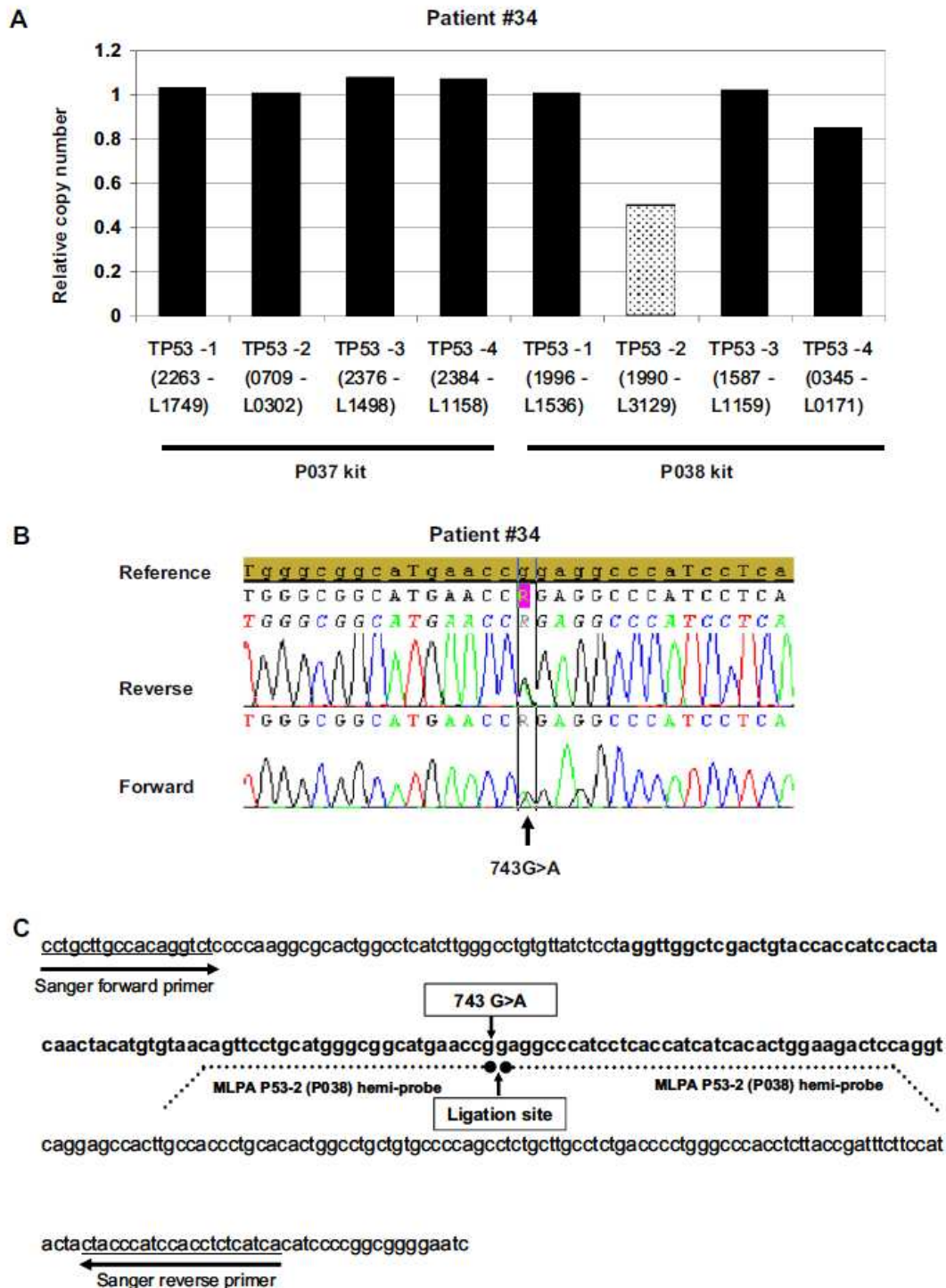


Figure 3 (A) Partial MLPA results in patient #34, indicating the loss of a single probe (TP53-2 1990-L3129, kit P038) in the *TP53* cluster (dotted bar). (B) Sequence chromatograms of patient #34, revealing a heterozygous missense mutation c.743G>A in the *TP53* exon 7. (C) Genomic position of TP53-2 1990-L3129 MLPA hemi-probes and sequencing primers. Bold nucleotides highlight the sequence of *TP53* exon 7; dotted lines indicate the position of the MLPA hemi-probes; underlined nucleotides and arrows show the position of the Sanger sequencing primers. The c.743G>A mutation found in patient #34 is located at the MLPA ligation site, which hampered probe hybridization and ligation, leading to a false-positive result.

respectively by iFISH using the LSI MYC probe and karyotype (#18, Figure 2A). In five patients, MLPA identified a trisomy 19, but the presence of the aberration in these cases was confirmed neither by karyotype nor by iFISH.

Discussion

This study aimed to further evaluate the place of the MLPA assay in routine diagnosis of clinically relevant genomic aberrations in CLL. We compared the data obtained with MLPA and iFISH, the gold-standard technique, to assess MLPA accuracy, and we analyzed in detail all discordant cases. Overall, MLPA detected 90.9% of the main recurrent aberrations (deletions of 13q, 17p, 11q, and +12) found with the iFISH method in 77 CLL patients. Conversely, two 17p13 deletions appeared to be false-positive MLPA findings due to the presence of point mutations in the *TP53* gene. Five trisomy 19 cases identified with MLPA were not confirmed by other cytogenetic techniques.

Discordances between the two techniques in the detection of main genomic aberrations were most often related to the low percentage of clonal aberrant cells, leading to false-negative MLPA results, thus further demonstrating that MLPA is less sensitive than iFISH. Previously, Al Zaabi et al. demonstrated in dilution experiments that MLPA can reliably detect the 13q14 deletion in samples containing at least 36% of cells bearing this aberration (14). Coll-Mulet et al. reported false-negative MLPA results in samples with <25% aberrant cells (12). Abdool et al. adjusted cut-off points for each individual MLPA probe, and this reduced the detection threshold to approximately 20% of aberrant cells (15). Only one study found an almost perfect correlation between iFISH and MLPA with a single false-negative result among 88 patients (13). In the latter study, a locus was considered abnormal if the RCN value was <0.95 for losses and >1.05 for gains, which corresponds to the detection limit of 10% of abnormal cells. In our experience, normal healthy donors' RCN values ranged between 0.85–1.15, indicating the detection threshold of 30% of aberrant cells. Of note, all false-negative cases in our study occurred in samples with 12–21% of aberrant cells. Thus, the detection level is variable and laboratory-dependent, but the MLPA detection seems to be reliable when the fraction of aberrant cells is approximately 25–30%, which is less sensitive than iFISH detection. A step of CD19+ cell selection can enrich samples in tumor cells and may therefore improve MLPA sensitivity (16); however, the introduction of this pre-enrichment procedure makes the routine analysis more difficult. In addition, even in highly purified CLL samples (>90% of tumor cells) obtained by Fabris and coworkers, the size of aberrant clones was variable, between approximately 20–100% (16). False-negative results were still observed in cases with 21–28% of aberrant cells, since the MLPA thresholds were set at 0.8 and 1.2, which corresponds to a detection sensitivity of 40%.

One of the discordant cases concerned the detection of a trisomy 12 in a patient with a complex karyotype. Total trisomy 12 is characteristic of CLL, and only a few cases show a partial trisomy 12 (17). MLPA probes target several 12p and 12q regions, enabling the detection of both total and partial trisomy 12, whereas iFISH using a centromeric probe would miss a partial trisomy 12 not involving the centromeric region.

Previously, Coll-Mulet et al. reported a case of 12q gain undetected with iFISH but revealed by MLPA (12). In our discordant case, a derivative chromosome 12 contained a part of the centromeric sequence and was detected with iFISH in 68% of cells. In contrast, the chromosome 12 MLPA profile was normal, suggesting that the marker chromosome did not contain any genomic regions targeted by the MLPA probes. This case suggests that the association of iFISH and MLPA enables a better characterization of such complex rearrangements.

The use of multiple probes for each locus was shown to enable a higher resolution of MLPA compared to iFISH in the mapping of genomic alterations (13,15). In particular, MLPA identified microdeletions at a single gene level in 13q– and 11q– cases (15). Stevens-Kroef identified a case with a partial loss of the *ATM* gene (13). In our study, however, two cryptic *TP53* deletions identified with MLPA were revealed to be point mutations in codons 248 and 342, which disrupted the hybridization of the MLPA probes and mimicked a deletion. *TP53* mutations are found in 4–37% of patients with CLL, and codon 248 is known to be one of the most common hot spots in CLL (18). Consequently, our findings suggest that single-probe MLPA abnormalities have to be taken with caution and investigated by means of molecular genetic techniques.

iFISH is known to underestimate the genomic complexity in CLL, because the standard probe panel is generally limited to the four main prognostically relevant regions. MLPA could overcome this limitation, because it explores additional genomic regions. In our study, MLPA revealed two additional aberrations: gains in 8q24 and 18q21. No 6q deletion was identified by MLPA in our cohort, although this aberration was reported to occur in 6–7% of CLL patients (19). In contrast, MLPA identified five cases (6.7%) of trisomy 19, which is a rare aberration described in only 1.7% of CLL patients studied using conventional cytogenetics (9); however, we did not confirm the chromosome 19 gains either by iFISH or karyotype analysis, suggesting that the MLPA chromosome 19 probes may give false-positive results. A number of CLL cases presenting a trisomy 19 and two patients with microdeletions at the 19q13.43 and 19p13.2 loci detected with MLPA were reported previously, but the validation studies using other techniques were not performed (13–15).

In conclusion, the MLPA assay, which allows for the simultaneous analysis of copy number aberrations for a large number of samples in a short time, may be used as a first-line diagnostic test in CLL to detect recurrent aberrations present in a significant proportion of leukemic cells. This approach needs to be complemented with iFISH and other molecular techniques, however, particularly in cases with normal or unusual MLPA profiles, to avoid the risk of false-negative or false-positive results. Thus, we conclude that MLPA may be a useful complementary but not alternative approach for iFISH testing of genomic aberration in CLL.

Acknowledgments

This work was supported by the Ligue Contre le Cancer (Auvergne, France). The authors are grateful to Mylène Bon, Christine Van Luchene, Delphine Voisin, Corinne Marie, and Farida Godeau for their expert technical assistance. L.V. and P.C. interpreted the data and drafted the manuscript; E.P.E. and N.P. contributed to the interpretation of results; O.T.,

R.G., R.V.M., P.V., and J.O.B. contributed to the article revisions; A.T. analyzed the data and wrote the final version of the manuscript.

Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cancer.2012.12.002>.

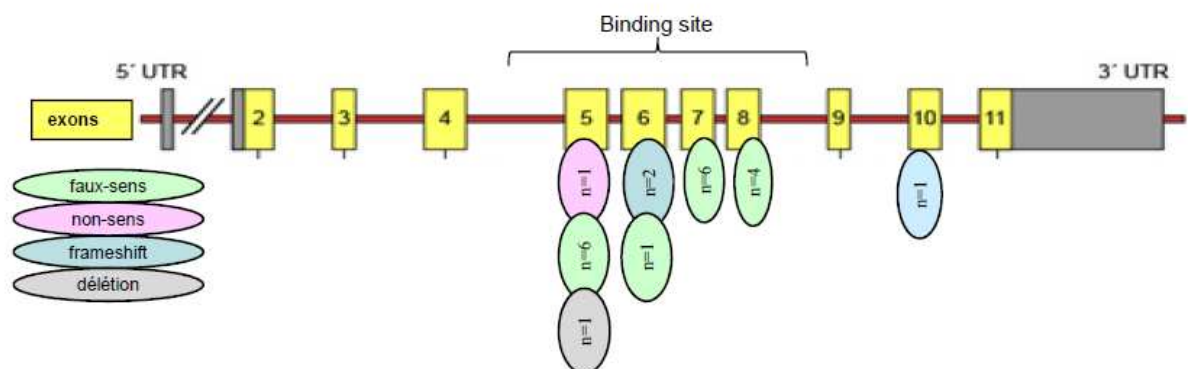
References

1. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 1990;323:720–724.
2. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910–1916.
3. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia* 2007;21:2442–2451.
4. Chapiro E, Lepage N, Radford-Weiss I, et al. Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leuk Res* 2010;34:63–68.
5. Novak U, Oppliger Leibundgut E, Hager J, et al. A high-resolution allelotyping of B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 2002;100:1787–1794.
6. Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S, et al. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad USA* 2004;101:1039–1044.
7. Nguyen-Khac F, Chapiro E, Lesty C, et al. Specific chromosomal IG translocations have different prognoses in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Blood Res* 2011;1:13–21.
8. Put N, Van Roosbroeck K, Konings P, et al. Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia with MYC translocations: a subgroup with an aggressive disease course. *Ann Hematol* 2012;91:863–873.
9. Sellmann L, Gesk S, Walter C, et al. Trisomy 19 is associated with trisomy 12 and mutated IGHV genes in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2007;138:217–220.
10. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008;111:5446–5456.
11. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57.
12. Coll-Mulet L, Santidrian AF, Cosials AM, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of genomic alterations in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2008;142:793–801.
13. Stevens-Kroef M, Simons A, Gorissen H, et al. Identification of chromosomal abnormalities relevant to prognosis in chronic lymphocytic leukemia using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;195:97–104.
14. Al Zaabi EA, Fernandez LA, Sadek IA, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification versus multiprobe fluorescence in situ hybridization to detect genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia: a tertiary center experience. *J Mol Diagn* 2010;12:197–203.
15. Abdool A, Donahue AC, Wohlgemuth JG, et al. Detection, analysis and clinical validation of chromosomal aberrations by multiplex ligation-dependent probe amplification in chronic leukemia. *PLoS One* 2010;5:e15407.
16. Fabris S, Scarcioia O, Morabito F, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization to detect chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: a comparative study. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50:726–734.
17. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, et al. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 2002;16:993–1007.
18. Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 2010;24:2072–2079.
19. Coll-Mulet L, Gil J. Genetic alterations in chronic lymphocytic leukaemia. *Clin Transl Oncol* 2009;11:194–198.

Tableau 9 : Caractéristiques des mutations *TP53* parmi la cohorte de 85 patients

patient	mutation séquence nucléotidique (estimation % du clone muté)	position	mutation Séquence protéique	type mutation	impact	cas répertoriés selon IARC (localisations les plus fréquentes)
Barb	c.529_546del18 (50%)	Exon 5	p.177_182del	délétion de 6 acides aminés sans frameshift	délétère probable (donnée non disponible)	13 (anus, testicule)
Haf	c.701A>G (30%)	Exon 7	p.Y234C	faux sens	délétère	144 (amygdales)
Lau	c.814G>T (70%)	Exon 7	p.V272L	faux sens	délétère	42 (gencive et langue)
Mag	c.814G>T (50%)	Exon 8	p.V272L	faux sens	délétère	42 (gencive et langue)
Rou	c.840 A>T (80%)	Exon 8	p.R280S	faux sens	délétère	23 (hypopharynx, tractus urinaire)
Tru	c.536A>G (10%)	Exon 5	p.H179R	faux sens	délétère	171 (uretère et jonction rectosigmoïdienne)
Trun	c.743G>A (50%)	Exon 7	p.R248Q	faux sens	délétère	939 (appareil génital féminin)
Via	c.476C>T (50%)	Exon 5	p.A159V	faux sens	délétère	55 (utérus, appareil respiratoire)
Gren	c.542G>C (30%)	Exon 5	p.R181P	faux sens	délétère	24 (sinus, os)
Rog	c.523C>G (50%)	Exon 5	p.R175G	faux sens	délétère	24 (système hématopoïétique, poumon)
Mic	c.818G>A (50%)	Exon 8	p.R273H	faux sens	délétère	851 (endocrine, pénis)
Cha	c.701A>G (30%)	Exon 7	p.Y234C	faux sens	délétère	144 (amygdales)
Gam	c.733G>T (50%)	Exon 7	p.G245C	faux sens	délétère	91 (péritoine)
Sou	c.467G>C (100%)	Exon 5	p.R156P	faux sens	délétère	45 (os)
Clem	c.524G>A (20%) c.763A>T (20%)	Exon 5 Exon 7	p.R175H p.I255F	faux sens faux sens	délétère délétère	1211 (tractus urinaire, ORL) 42 (palais, péritoine)
Lag	c.625_626del2 (70%)	Exon 6	p.R209Kfs6	frameshift	délétère probable	44 (glandes salivaires)
Per	c.618_634del (100%)	Exon 6	p.L206Ffs2X	frameshift	non décrit	non décrit
Vie	c.493C>T (80%) c.1025_1060del (40%)	Exon 5 Exon 10	p.Q165X p.R342Qfs39X	non sens frameshift	délétère non décrit	48 (nasum, vessie) non décrit
Nau	c.584T>C (30%) c.673-2A>C (15%)	Exon 6 intron 7	p.I195T -	faux sens site de splice	délétère délétère probable	106 (utérus, palais) 4 (système hématopoïétique)
Dea	c.842A>T (25%) c.673-37C>T (50%)	Exon 8 Intron 6	p.D281V -	faux sens non décrit	délétère non délétère probable	5 (os, ganglion) non décrit
Har	c.783-11A>G (40%)	Intron 7	-	non décrit	non délétère probable	non décrit
Joc	c.993+1G>A (80%)	Intron 9	-	site de splice	délétère probable	17 (pancréas, ovaire)

Figure 26 : répartition et type des 22 mutations *TP53* exoniques



4. TRAVAUX EN COURS

Notre équipe a récemment complété le travail sur les télomères et l'instabilité génomique par :

1/ la recherche de mutations du gène *TP53* par séquençage direct

2/ l'étude de l'expression des autres membres du complexe shelterin avec la quantification des transcrits des gènes *RAP1*, *TPP1* et *TIN2* par RT-PCR quantitative en temps réel

3/ La recherche de signes de fragilité télomérique par FISH pantélomérique (recherche d'associations télomériques, de perte d'un signal télomérique sur une ou deux des chromatides soeurs (délétion terminale), de doublet télomérique sur une ou deux des chromatides soeurs (duplication terminale ou signal télomérique multiple), de fusions de chromatides soeurs ou de chromosome double minute contenant des séquences télomériques) (**Figure 27**).

L'ensemble de ces analyses a été effectué dans une série de 85 patients pour lesquels nous disposons des autres paramètres télomériques (longueur des télomères, expression de hTERT, POT1, TRF1 et TFR2), des données cytogénétiques et des principaux marqueurs du pronostic. L'un des objectifs de ce travail complémentaire était d'évaluer l'impact des mutations *TP53* sur la dynamique des télomères dans une série de patients atteints de LLC.

Nous avons mis en évidence **26 mutations** chez 22 patients : 22 mutations sont exoniques (19 patients) et 4 sont introniques (4 patients) (**Tableau 9**).

Parmi les 22 mutations exoniques, 17 (77%) sont des mutations faux-sens, 1 (3%) est non-sens, 3 (14%) sont des mutations décalant le cadre de lecture (frameshift) aboutissant à l'apparition d'un codon stop prématuré avec protéine tronquée et 1 (3%) est une délétion de 18 pb sans décalage du cadre de lecture (**Figure 26**). Vingt-et-une mutations ont été retrouvées dans le site de liaison à l'ADN (exon 5 à 8) ; une seule a été retrouvée dans l'exon 10. Vingt mutations sont décrites sur le site IARC comme délétères et aboutissant à une protéine non fonctionnelle ; les 2 mutations restantes (frameshift : p.L206Ffs2X et p.R342Qfs39X) ne sont pas décrites dans la littérature mais entraînent l'apparition d'une protéine tronquée.

Figure 27 : Signes de fragilité télomérique en FISH pantélomérique

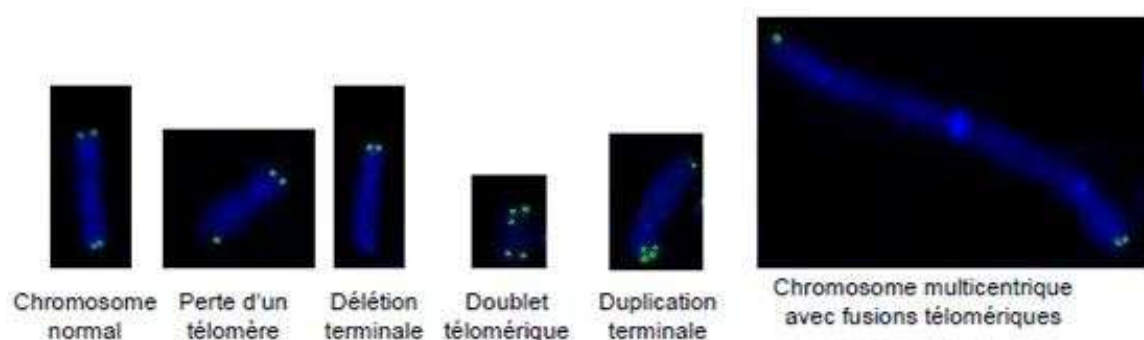
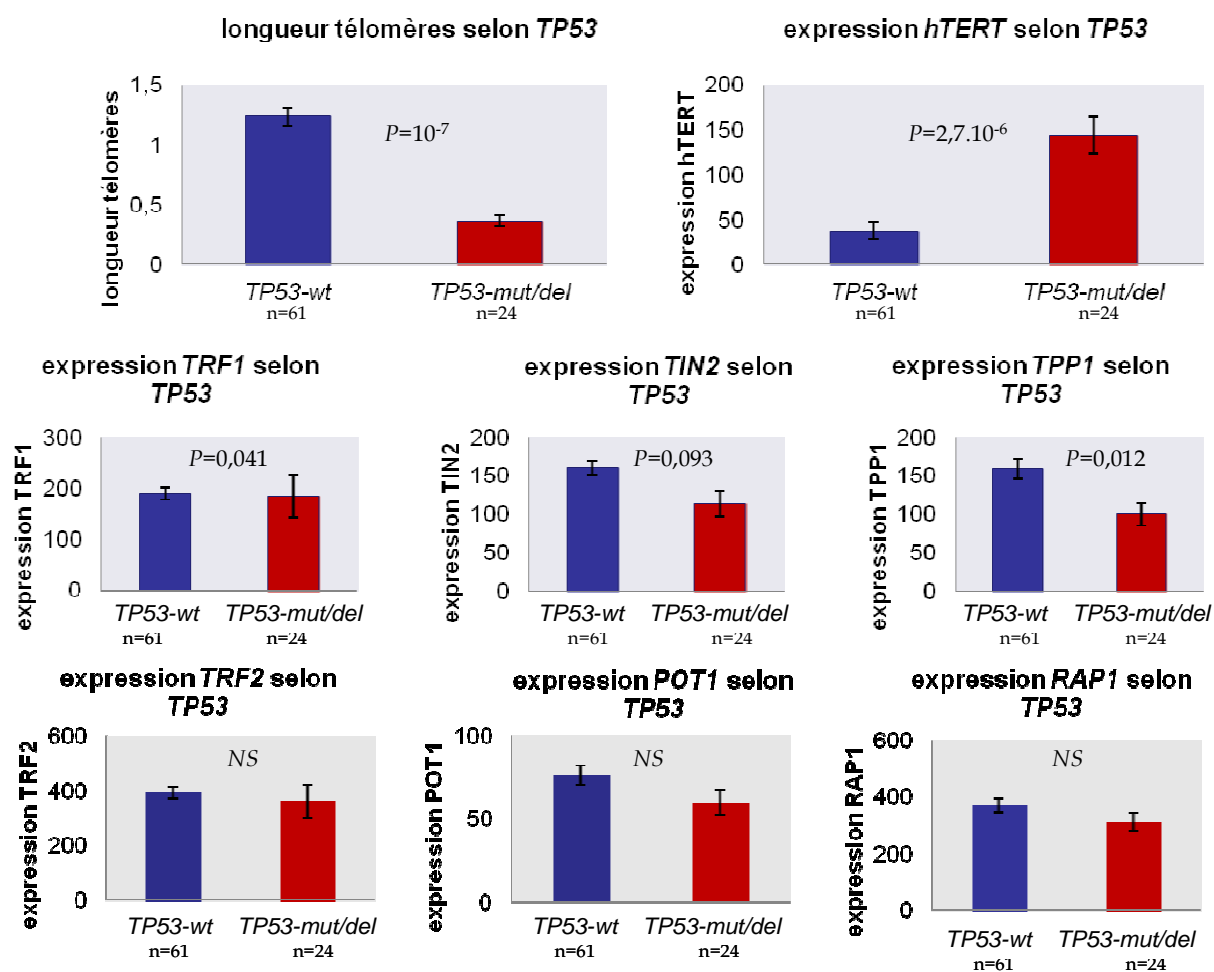


Figure 28 : Longueur des télomères, expression de *hTERT* et des gènes du complexe shelterin en fonction de la présence d'une anomalie de *TP53*



Deux des mutations introniques se situent au niveau de sites d'épissage des introns 7 et 9, empêchant leur excision et entraînant un décalage du cadre de lecture. Les 2 autres mutations sont des variations nucléotidiques apparemment non délétères. L'un des patients porteur d'une mutation intronique présente également deux mutations exoniques.

Concernant **l'analyse cytogénétique**, 38 patients (44.7%) ont un caryotype normal et 47 patients (55,3%) présentent au moins une anomalie cytogénétique. Vingt-six patients (30.5%) présentent une seule anomalie caryotypique, 9 (10.6%) présentent 2 anomalies et 12 patients (14.1%) ont un caryotype complexe (≥ 3 anomalies). La technique de FISH met en évidence 14 délétions 17p (16,4%), 11 délétions 11q (12,9%), 13 trisomies 12 (15,3%) et 49 délétions 13q (57,6%), associées ou non entre elles.

En définitive, dans l'ensemble de la cohorte, 61 patients ne présentent ni délétion 17p ni mutation de *TP53*, 10 patients sont mutés + délétés pour *TP53*, 10 patients sont porteurs d'une mutation *TP53* (sans délétion 17p) et 4 patients sont porteurs d'une délétion 17p (sans mutation *TP53*) (seuls les patients porteurs d'une mutation délétère sont pris en compte).

Nous ne montrons aucune différence significative de nombre d'anomalies caryotypiques ($P=0,17$), de longueur des télomères ($P=0,45$), d'expression de *hTERT* ($P=0,36$) et des gènes du complexe shelterin *TRF1* ($P=0,64$), *TRF2* ($P=0,18$), *POT1* ($P=0,13$), *RAP1* ($P=0,94$), *TPP1* ($P=0,60$), *TIN2* ($P=0,88$) entre les patients *TP53^{mut}* (sans délétion 17p) et les patients délétés (avec ou sans mutation *TP53*). Ainsi, nous avons pu constituer un groupe de patients porteurs d'anomalies de *TP53*, mutés et/ou délétés (*TP53-mut/del*).

Les télomères sont retrouvés très significativement plus courts chez les patients *TP53-mut/del* ($P=10^{-7}$) par rapport aux patients ne présentant pas d'anomalies de *TP53* (*TP53-wt*) ; il existe également une surexpression significative de *hTERT* ($P=2,7.10^{-6}$). Enfin, l'expression des gènes *TRF1* ($P=0,041$) et *TPP1* ($P=0,012$) est significativement diminuée dans le groupe des patients *TP53-mut/del* (**Figure 28**). La diminution d'expression est à la limite de significativité pour le gène *TIN2* ($P=0,093$).

Concernant les données cytogénétiques, le nombre moyen d'aberrations chromosomiques au caryotype est plus important lorsqu'il existe des anomalies de *TP53*

Figure 29 : Longueur des télomères, expression de *hTERT* et nombre moyen d'anomalies caryotypiques en fonction des anomalies génomiques récurrentes

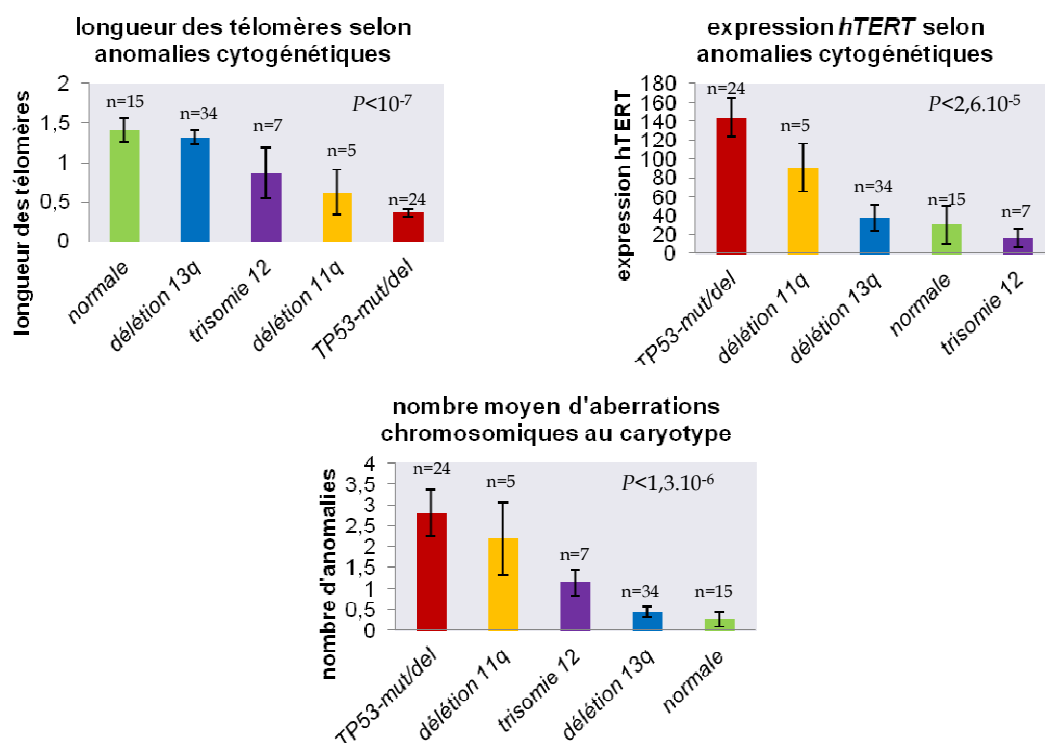


Tableau 10 : FISH pantélomérique ; nombre de signal télomérique multiple et de perte de signal chez les patients *TP53-mut/del* et *TP53-wt*

	effectif	nombre moyen de signaux télomériques perdus	effectif	nombre moyen de signal télomérique multiple
		$P=0,01$		$P=0,85$
<i>TP53-mut/del</i>	n=5	4,9	n=5	0,7
<i>TP53-wt</i>	n=5	0,9	n=5	0,65

(**Figure 29**). Comme nous l'avions déjà démontré, la longueur des télomères diminue ($P=0,0000001$) et le niveau d'expression de *hTERT* augmente ($P=0,000026$) lorsqu'il existe une anomalie cytogénétique défavorable, ceci étant plus marqué avec la présence d'une anomalie de *TP53* (*TP53-mut/del*).

L'étude télomérique par FISH pantélomérique a été réalisée pour 10 patients. Les patients *TP53-mut/del* présentent environ cinq fois plus de perte de signaux télomériques que les patients *TP53-wt* ($P=0,01$). Aucune différence concernant la présence de signal télomérique multiple n'a été mise en évidence entre les deux groupes ($P=0,85$) (**Tableau 10**). Des images de fusions et d'associations télomériques (avec perte des signaux télomériques) ont été observées chez 2 patients *TP53^{mut}*.

Ces résultats démontrent que les paramètres télomériques et les aberrations chromosomiques sont affectés par la présence d'une dysfonction de la voie p53, qu'il s'agisse indifféremment de la conséquence d'une délétion 17p ou d'une mutation *TP53*. Ceci conforte nos précédents résultats concluant à l'impact des délétions 17p et 11q sur l'instabilité génomique.

D'autre part, ces résultats soulignent le rôle de la dérégulation de l'expression des gènes *TPP1* et *TIN2* dans le désassemblage du complexe shelterin et l'altération des télomères.

IV- CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Bien que les marqueurs de pronostic soit nombreux dans la LLC, aucun n'est univoque et la découverte de nouveaux marqueurs du pronostic reste importante, pour stratifier les malades au diagnostic en vue du choix thérapeutique et améliorer la compréhension des phénomènes physiopathologiques. A titre d'exemple, les anomalies de *TP53*, qui représentent à l'heure actuelle le marqueur prédictif le plus important, ne concernent que 40% des patients réfractaires au traitement. Cela sous-entend que d'autres voies de signalisation sont mises en jeu dans l'agressivité et la chimiorésistance de cette pathologie.

Dans cette optique, nous avons donc choisi d'explorer **l'expression d'un membre anti-apoptotique de la famille BCL2, le gène *MCL1***, qui semble être impliqué dans la résistance à l'apoptose des lymphocytes de LLC et dans la réponse au traitement, ainsi que certains des mécanismes moléculaires permettant la régulation de cette expression au cours de la LLC. En effet, les protéines de la famille BCL2, particulièrement MCL1, sont régulées par un grand nombre de processus cellulaires, incluant l'activation du BCR et la signalisation via CD40, VEGF, IL6 et la voie de la PI3K/AKT. Etant donné que la capacité des cellules de LLC à répondre à ces signaux est fortement liée à la plupart des marqueurs du pronostic, il semblait intéressant d'évaluer la relation entre ces marqueurs, en particulier le statut IgV_H, l'expression de 2 membres de la famille BCL2, précisément *BCL2* et *MCL1*, ainsi que l'expression des gènes *VEGF* et *IL6*.

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre le niveau de l'expression du transcrit *MCL1* et les marqueurs du pronostic (stade selon Binet, statut mutationnel des IgV_H, temps de doublement de la lymphocytose, taux de β 2microglobuline, taux de thymidine kinase, expression de CD38 et expression de *hTERT*). Nous avons par contre mis en évidence que **l'expression de *MCL1* est un marqueur prédictif** de la survie globale parmi l'ensemble des patients et parmi les stades précoces ; au sein des stades A, ce marqueur est également prédictif de la survie sans traitement. Ainsi, l'expression de *MCL1* permet d'identifier précocement les formes de LLC à haut risque et faible risque d'évolution défavorable.

Pepper *et al.* a par la suite mis en évidence une corrélation entre une forte expression protéique de MCL1 (déterminée sur cellules fraîches par CMF et Western Blot) et certains marqueurs péjoratifs du pronostic, comme le stade avancé de la maladie, le temps de doublement court, le statut IgV_H non muté, l'expression de CD38 et l'expression de ZAP-70, dans une série de 185 patients [Pepper *et al.*, 2008]. De plus, le niveau d'expression de MCL1

et le ratio MCL1/BAX ont été fortement corrélés à la résistance à la fludarabine in vitro, confirmant le rôle de MCL1 dans la chimiorésistance, qui avait été suggéré par les résultats des études antérieures [Kitada *et al.*, 1998; Saxena *et al.*, 2004]. D'autre part, une forte expression de MCL1 et un ratio MCL1/BAX élevé se sont avérés prédictifs de la survie sans traitement, pour l'ensemble des patients et pour les patients en stade A uniquement ; cependant, ces 2 marqueurs perdaient leur valeur pronostique en analyse multivariée (vs stade selon Binet, statut IgV_H et expression de CD38).

Tout comme dans notre travail, Pepper *et al.* n'a pas mis en évidence de corrélation entre l'expression de *BCL2* et les marqueurs classiques du pronostic, ni de valeur pronostique à l'expression de *BCL2* (ou de *BCL2/BAX*). Ces différences entre MCL1 et *BCL2* peuvent s'expliquer, considérant que l'expression de MCL1 est régulée par les voies de signalisation classiques de la LLC, incluant le BCR, ce qui n'est pas le cas de façon évidente pour *BCL2*. De façon intéressante, l'analyse longitudinale a démontré que l'expression de MCL1 est remarquablement constante au cours du temps, suggérant que cette expression est étroitement régulée par la cellule maligne et ne semble pas significativement modifiée par les traitements.

Nous avons également démontré que **l'expression de MCL1 est fortement corrélée à l'expression de VEGF** (mais n'est pas corrélée à l'expression de l'*IL6*) confirmant le rôle de cette voie de signalisation dans la survie des lymphocytes tumoraux et suggérant que VEGF pourrait réguler positivement MCL1 selon un mode autocrine. Pepper *et al.* a d'ailleurs démontré que l'effet pro-survie de VEGF est neutralisé par un inhibiteur intracellulaire de la signalisation VEGF, alors qu'un inhibiteur extracellulaire (agissant sur VEGF exogène) ne bloque pas cet effet. Ceci démontre que les cellules de LLC utilisent une boucle de survie autocrine interne impliquant VEGF [Pepper *et al.*, 2007]. D'autres travaux ont démontré que l'inhibition de VEGF entraîne une diminution d'expression de MCL1 et induit l'apoptose [Lee *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2005].

Sur le plan de la signalisation, il est connu que VEGFR1 et VEGFR2 sont associés physiquement à STAT1 et STAT3 ; p-STAT1 et p-STAT3 (phosphorylé sur un résidu sérine au cours de la LLC, et non sur un résidu tyrosine, comme c'est classiquement le cas) sont retrouvés de manière abondante dans le cytoplasme des lymphocytes de LLC, mais seul Ser-727-p-STAT3 est retrouvé dans le noyau de ces cellules [Lee *et al.*, 2005]. L'inhibition de l'activation de VEGFR par des inhibiteurs spécifiques entraîne en outre une diminution sélective du niveau d'expression de Ser-727-p-STAT3 et de MCL1, ce qui semble confirmer le rôle central de ce facteur transcriptionnel dans la transduction du signal VEGF et la prolongation de la survie de ces cellules de LLC.

La régulation de l'expression de *MCL1* n'est cependant pas univoque, et divers facteurs autres que VEGF interviennent sur un plan transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Il a été notamment rapporté qu'une signalisation prolongée à travers le BCR entraîne une activation prolongée d'AKT, qui peut réguler positivement l'expression de *MCL1* [Longo *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 1999].

D'autre part, miR-29 est un micro-ARN connu pour réguler négativement *MCL1* [Mott *et al.*, 2007]. Dans des modèles murins, la dérégulation de l'expression de mir-29 contribue à la genèse des formes indolentes de LLC [Santanam *et al.*, 2010], possiblement par le biais de l'expression de *MCL1*. Cette hypothèse est étayée par des résultats obtenus sur cellules primaires de LAM, montrant un enrichissement significatif en ARNm de gènes anti-apoptotiques, incluant *MCL1*, de façon inversement corrélée à l'expression de miR-29 [Garzon *et al.*, 2009].

Par ailleurs, les analyses de transcriptome prédisent que *MCL1* est une cible du cluster de micro-ARN miR-15a et miR-16-1, qui est connu pour réguler négativement *BCL2* au niveau post-transcriptionnel et qui est fréquemment emporté par la délétion 13q [Aqeilan *et al.*, 2010]. Un modèle de circuit fonctionnel unissant l'expression de *MCL1*, les anomalies cytogénétiques (ou altérations de *TP53*) et l'expression de certains microARN a d'ailleurs récemment été proposé [Fabbri *et al.*, 2011]. Selon ce modèle, *TP53* (situé en 17p) constitue le lien moléculaire entre les clusters de gènes codant miR-15a/miR-16-1 (situés en 13q) et miR-34b/miR-34c (situé en 11q). En effet, la protéine p53 est directement régulée négativement par miR-15a/miR-16-1. Aussi, la perte de l'expression de miR-15a/miR-16-1 par délétion 13q induit non seulement une augmentation des niveaux d'expression de *MCL1* et *BCL2*, mais également de p53. Ainsi, chez les patients porteurs de délétion 13q, bien que la survie cellulaire soit favorisée, la voie p53 demeure intacte et fonctionnelle, ce qui permet de contrôler la croissance cellulaire, donc de limiter l'augmentation trop importante de la masse tumorale. Ce phénomène peut expliquer pourquoi la délétion 13q est associée aux formes indolentes de LLC. De plus, l'augmentation des niveaux de p53 s'accompagne chez ces patients d'une transactivation de miR-34b/miR-34c, qui ont pour effet de diminuer le niveau d'expression de ZAP-70, ce qui contribue également à expliquer l'évolution lente des LLC 13q-.

Plus récemment, il a été démontré que le gène *FBXW7*, l'un des gènes muté de façon récurrente au cours de la LLC [Wan *et al.*, ASH 2011], est une ubiquitine-ligase qui gouverne l'apoptose cellulaire en ciblant *MCL1*. En effet, Wertz *et al.* a démontré que la dégradation

de MCL1 est bloquée dans des cellules déficientes pour *FBXW7* [Wertz *et al.*, 2011]. Une relation inverse entre perte d'expression de *FBXW7* et surexpression de MCL1 a également été mise en évidence dans des lignées cellulaires de LAL-T [Inuzuka *et al.*, 2011]. De plus, ces cellules déficientes pour *FBXW7* sont résistantes à l'ABT-737, un BH3-mimétique antagoniste de BCL2 rapporté comme étant efficace sur des cellules primaires de LLC [Mason *et al.*, 2009]. A l'inverse, le rétablissement de l'expression de *FBXW7* ou la diminution de l'expression de MCL1 restaure la sensibilité à l'ABT-737, indiquant que MCL1 constitue un court-circuit cellulaire induisant la survie et permettant aux cellules déficientes pour *FBXW7* d'échapper à l'apoptose.

Enfin, le marqueur de surface membranaire CD44, dont l'expression est médiée par le microenvironnement, régule la réponse apoptotique via MCL1 dans des modèles de souris transgéniques atteintes de LLC et dans des cellules de LLC humaines. En effet, l'inhibition de CD44 par anticorps diminue la viabilité cellulaire dans des cultures en suspension, dans des modèles de contact stromal et *in vivo*, via la réduction de l'expression de MCL1 et l'activation des caspases. Par ailleurs, les cellules leucémiques issus de souris transgéniques CD44^{-/-} présentent un niveau d'expression de *MCL1* moindre et une propension à l'apoptose plus élevée ; la masse tumorale de ces souris est plus faible et leur survie plus prolongée [Fedorchenko *et al.*, 2013].

Des approches thérapeutiques ciblant cette voie de signalisation ont par la suite été rapportées. Par exemple, les BH3 mimétiques, dont l'ABT-737 cité ci-dessus, sont des petites molécules ciblant les protéines de la famille BCL2. Mason *et al.* a rapporté que l'ABT-737 induit l'apoptose de cellules primaires de LLC dans une proportion intéressante de cas (21/30) ; cette efficacité est plus nette en association avec des agents cytotoxiques qu'en mono-thérapie [Mason *et al.*, 2009]. Cependant, l'action de l'ABT-737 semble majoritairement cibler BCL2 et BCLXL, plutôt que MCL1.

Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) ciblant VEGFR ont également été utilisés, comme le vatalanib et le pazopanib ; ces 2 molécules diminuent la phosphorylation de VEGFR et induisent puissamment l'apoptose des cellules de LLC *in vitro* et *in vivo* [Paesler *et al.*, 2010]. Ce traitement induit également une diminution de l'expression des protéines XIAP et MCL1. Il existe là aussi une synergie entre l'action de ces ITK et celle des cytostatiques plus conventionnels. Bien que cette approche ciblée paraisse prometteuse, les résultats d'essais de phase II utilisant 3 anti-VEGF différents en monothérapie (bevacizumab,

AZD2171 ou sunitinib malate) ont montré à l'inverse le manque d'efficacité de ces thérapies chez des patients réfractaires ou en rechutes [Shanafelt *et al.*, 2010].

Tout comme les ITK ciblant VEGF, l'inhibiteur multi-kinase sorafenib induit l'apoptose dans les cellules primaires de LLC *in vitro* ; cette apoptose est précédée par une diminution rapide de l'expression de MCL1 du fait d'une inhibition de la traduction de la protéine [Huber *et al.*, 2011]. Cependant, dans le travail de Huber, l'anticorps monoclonal anti-VEGF bevacizumab ne provoque pas l'apoptose des lymphocytes de LLC, suggérant que le sorafenib induit la mort cellulaire indépendamment de la signalisation de VEGF.

L'existence de telles stratégies d'inhibition souligne la nécessité d'appréhender les phénomènes de régulation de l'expression de *MCL1*, dans le but de définir des groupes de patients pouvant répondre ou non à ces nouvelles approches thérapeutiques. En ce sens, notre équipe étudie actuellement les mécanismes de régulation de MCL1 par la protéine MNDA (Myeloid Nuclear Differentiation Antigen). La relation entre MCL1 et MNDA a initialement été décrite dans les polynucléaires neutrophiles : MNDA, protéine nucléaire à l'état basal, est relocalisée dans le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles apoptotiques, où elle interagit avec MCL1 pour provoquer sa dégradation par le protéasome et donc favoriser l'apoptose mitochondriale [Milot *et al.*, 2011]. Il semble donc intéressant d'évaluer l'expression de *MCL1* et de *MNDA* dans les lymphocytes B de LLC. Ce travail s'effectue en collaboration avec l'équipe du Pr E. Milot (Centre de Recherche Maisonneuve-Rosemont ; Université de Montréal) qui travaille depuis plusieurs années sur le rôle et l'expression de MNDA [Fotouhi-Ardakani *et al.*, 2010 ; Milot *et al.*, 2011 ; Milot *et al.*, 2012].

Bien que la progression tumorale dans la LLC soit en grande partie liée à un défaut d'apoptose, les cellules leucémiques semblent également pouvoir subir un nombre de divisions significatif. **L'étude des télomères**, qui raccourcissent à chaque division cellulaire, a fourni des arguments en faveur de l'existence d'un compartiment prolifératif dans la population tumorale de la LLC ; l'érosion télomérique importante observée dans certains cas de LLC indique également que le clone leucémique peut avoir une activité proliférative accrue. Sur le plan physiopathologique, cette érosion télomérique, qui accompagne la croissance tumorale, pourrait favoriser la survenue des aberrations chromosomiques et promouvoir ainsi l'évolution de la leucémie. De façon intéressante, le travail de Lin *et al.* a montré que la dynamique télomérique des cellules de LLC en stade C est totalement semblable à celle de cellules en crise ; en d'autres termes, les cellules de LLC subiraient une

crise télomérique durant la progression de la maladie, qui serait responsable de l'instabilité génomique [Lin *et al.*, 2010].

Notre travail a contribué à **démontrer la relation entre la survenue d'anomalies génomiques et le statut télomérique, évalué pour la première fois dans la littérature de façon globale** par la longueur des télomères, l'expression de *hTERT* et l'expression des gènes du complexe shelterin. Nous avons ainsi mis en évidence **3 sous-groupes de patients présentant des profils cytogénétiques et télomériques distincts** : le premier groupe combine une cytogénétique favorable, des télomères longs, une expression faible ou absente de *hTERT* et une expression forte des gènes du complexe shelterin ; le troisième groupe se caractérise par de multiples aberrations chromosomiques (en particulier délétion 17p et 11q), une augmentation de l'expression de *hTERT* et une diminution de la longueur des télomères et de l'expression de *TRF1*, *TRF2* et *POT1* ; le deuxième groupe est intermédiaire. L'altération du statut télomérique est par ailleurs associée à des facteurs de pronostic défavorable, comme l'absence de mutation des IgV_H, l'expression de CD38 et le doublement rapide de la lymphocytose. Cette étude vient compléter les données précédemment publiées, qui montraient soit l'impact clinique du raccourcissement des télomères ou de l'expression de *hTERT*, soit l'existence d'une association entre raccourcissement télomérique et nature des anomalies génomiques, soit enfin l'existence d'altérations d'expression du complexe shelterin, sans que ces divers paramètres télomériques ne soient confrontés les uns aux autres [Tchirkov *et al.*, 2004 ; Poncet *et al.*, 2008 ; Roos *et al.*, 2008 ; Brugat *et al.*, 2010 ; Rampazzo *et al.*, 2012]

D'après les données de la littérature, on peut légitimement émettre l'hypothèse qu'une érosion télomérique sévère ne peut avoir lieu dans les cellules de LLC que si les mécanismes de contrôle des télomères sont défaillants. En ce sens, **la perte de la fonction p53** entraîne la disparition d'une des voies de signalisation majeure responsable de l'apoptose en cas de raccourcissement extrême des télomères, et favorise par conséquent la survie cellulaire, la poursuite des divisions cellulaires, l'érosion télomérique et la survenue d'instabilité génomique. Les travaux de Roos *et al.* et de Rampazzo *et al.* ont d'ailleurs montré que la longueur des télomères est corrélée à la nature des anomalies génomiques, les télomères courts étant particulièrement associés à la survenue d'anomalies cytogénétiques défavorables (délétion 17p et 11q, caryotypes complexes) [Roos *et al.*, 2008 ; Rampazzo *et al.*, 2012]. Dans notre étude, l'étude des clusters cytogénétiques montre que le groupe comprenant la majorité des anomalies de structure, incluant les délétions 17p et 11q, se caractérise bien par des télomères courts, mais aussi par une expression forte de *hTERT* et une diminution des

niveaux d'expression des gènes du complexe shelterin. Ce travail confirme l'association entre la perte des gènes *TP53* et *ATM* et la survenue d'altérations télomériques globales favorisant l'instabilité génomique. Nous avons par la suite montré qu'une relation similaire existe entre mutation *TP53* et perturbation du statut télomérique, avec raccourcissement des télomères, forte expression de *hTERT*, diminution d'expression des gènes du complexe shelterin chez les patients *TP53^{mut}* et signes de fragilité télomérique en FISH. La perte de signal télomérique (plus fréquente chez les patients *TP53-mut/del*) témoigne d'une érosion télomérique avancée ; à l'inverse, il ne semble pas exister d'anomalie de la réplication télomérique, car le nombre de signaux télomériques multiples n'augmente pas dans ce sous-groupe de patients.

De façon intéressante, p53 est un régulateur négatif de *hTERT* ; la perte de sa fonction pourrait donc favoriser l'activation de la télomérase, nécessaire à l'immortalisation cellulaire [Xu *et al.*, 2000]. L'altération de la voie p53 a également été associée à une augmentation d'expression de *C-MYC*, qui agit putativement comme régulateur positif de *hTERT*, et qui pourrait se combiner à l'effet de la perte de p53 [Kyo *et al.*, 2000]. Cependant, il a été récemment démontré que la signature d'expression génique associée à mutation+délétion *TP53* est majoritairement dominée par la sous-expression de *TP53* et d'autres gènes présents sur le bras court du chromosome 17 [Lin *et al.*, 2013] ; ceci indique que l'expression génique des patients *TP53* mutés+délétés reflètent surtout la perte de matériel codant en 17p. Ainsi, cette signature d'expression ne semble découler ni de la perte de l'activité régulatrice transcriptionnelle de p53 sauvage, ni d'un gain de fonction de la protéine p53^{mut} avec régulation transcriptionnelle aberrante. Néanmoins, ces résultats d'expression ont été obtenus chez 4 patients, ce qui ne reflète probablement pas la grande diversité des mutations *TP53* et la variabilité de leurs conséquences cliniques et oncogéniques ; cette variabilité a été notamment suggérée par l'étude de Trbusek *et al.* montrant le pronostic plus péjoratif des patients porteurs de mutations faux-sens situées dans le domaine de liaison de l'ADN comparativement aux autres mutations *TP53* [Trbusek *et al.*, 2011]. Il est par ailleurs classiquement admis que la surexpression de *hTERT* est la conséquence directe de l'érosion télomérique (plutôt que de l'altération de voies de signalisation), ce qui est reflété par l'association télomères courts/forte expression de *hTERT*, dans notre travail comme dans d'autres publications [Terrin *et al.*, 2007 ; Roos *et al.*, 2008 ; Rampazo *et al.*, 2012].

Zenz *et al.* a rapporté que les LLC avec délétion 17p présentent une complexité génomique plus marquée que les LLC avec mutation *TP53* seule, sans délétion de l'allèle restant [Zenz *et al.*, 2008]. Nos résultats récents ne retrouvent pas cette disparité entre patients

porteurs de mutation *TP53* et patients porteurs de délétion 17p ; leur profil d'anomalies cytogénétiques est au contraire superposable, comme leurs caractéristiques télomériques.

De la même façon que p53, ATM est un médiateur clé de la réponse cellulaire aux cassures double-brin de l'ADN par activation de la protéine p53 ; ainsi, **les altérations d'ATM** résultent en une diminution de la phosphorylation de p53, une perturbation des phénomènes de réparation des lésions de l'ADN et facilitent la poursuite des divisions cellulaires, donc l'érosion télomérique extrême, au-delà du seuil qui entrainerait théoriquement la sénescence réplivative [Britt-Compton *et al.*, 2012]. Il est clair dans notre travail que la délétion 11q avec perte d'*ATM* s'accompagne d'un plus grand nombre d'anomalies génomiques et d'une diminution d'expression des gènes du télosome, conséquence du raccourcissement télomérique.

Ouillette *et al.* a rapporté l'existence de pertes fréquentes des gènes *MRE11A* et *H2AFX* en cas de délétion 11q avec perte d'*ATM* ; ces 2 gènes sont eux aussi connus pour leur rôle dans la réparation des lésions double-brin de l'ADN, ce qui suggère l'existence d'un défaut composite de la réparation en cas de délétion 11q, dont les effets se conjugueraient pour générer l'instabilité génomique. Dans cette étude, la perte de ces différents acteurs de la réparation est d'ailleurs corrélée à la complexité génomique et à l'agressivité de la maladie [Ouillette *et al.*, 2010].

Enfin, la sous-bande 11q23.1 contient également un cluster de gènes codant 2 microARN, miR-34b et miR-34c ; ces microARN sont eux-même physiologiquement transactivés par p53 et constituent les médiateurs de certaines conséquences fonctionnelles de l'activation de p53 comme l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence [Hermeking *et al.*, 2007 ; Corney *et al.*, 2007]. De cette façon, la délétion 11q est susceptible de favoriser l'instabilité génomique par altération de la voie p53 liée à la diminution d'expression de 2 de ses effecteurs, miR-34b et miR-34c.

Cependant, on peut à l'inverse proposer que les **anomalies d'expression des composants du complexe shelterin constituent un mécanisme primaire à l'origine de la dysfonction télomérique dans la LLC**. La perte de la protection télomérique par les protéines du télosome mimerait ainsi une lésion de l'ADN et activerait certaines kinases comme ATM ou ATR, provoquant des réparations inappropriées et conduisant en définitive à l'instabilité génomique. A titre d'exemple, il a été démontré chez la souris qu'en l'absence de TRF1, la fourche de réplication ne progresse pas correctement au niveau des répétitions

TTAGGG, entraînant l'activation de la kinase ATR en phase S ; ceci s'accompagne d'un phénotype de fragilité télomérique en FISH métaphasique, sous forme de doublets télomériques, de fragmentation des signaux télomériques voire d'associations télomériques [Sfeir *et al.*, 2009]. Nous avons montré dans notre travail que parmi les patients caractérisés par des télomères longs et un faible nombre d'anomalies génomiques, se trouve un groupe de 7 patients présentant une diminution significative du niveau d'expression des membres du télosome ; ces 7 patients ne présentent pas d'augmentation du nombre d'aberrations génomiques. Ceci suggère que l'altération du complexe shelterin n'est pas suffisante pour induire une instabilité génomique lorsque les télomères sont encore suffisamment longs.

Néanmoins, Augereau *et al* a récemment démontré qu'il existe une diminution d'expression des gènes *TPP1* et *TIN2* chez des patients en stade A dont les télomères ne sont pas raccourcis, mais pourtant dysfonctionnels ; il faut préciser que la dysfonction télomérique n'est pas évaluée dans cette étude par le nombre d'anomalies génomiques mais par l'augmentation du recrutement des facteurs de réparation de l'ADN [Augereau *et al.*, 2012]. Dans le même sens, nous avons montré l'existence d'une diminution d'expression de *TPP1* et *TIN2* chez les patients présentant une altération de *TP53*, c'est-à-dire des patients présentant des télomères courts et dysfonctionnels. Il est intéressant de préciser qu'il n'existe pas d'arguments dans la littérature permettant d'évoquer l'existence de phénomènes directs de régulation transcriptionnelle ou non-transcriptionnelle de l'expression des membres du complexe shelterin par p53. D'après ces résultats, la dérégulation de l'expression du gène *TPP1* pourrait constituer un événement central dans le désassemblage du complexe shelterin et l'altération des télomères. On peut en effet imaginer que la diminution d'expression de *TPP1* perturbe la structure du télomère et mime une lésion de l'ADN, ce qui explique le recrutement plus important de facteurs de réparation au niveau de l'extrémité télomérique ; ce phénomène pourrait dans un premier temps compenser la sous-expression de *TPP1* sans nécessairement conduire à la survenue d'anomalies génomiques. Cependant, l'association de cette sous-expression de *TPP1* à une anomalie de la réparation de l'ADN, comme une perturbation des voies ATM et p53, romprait cet équilibre et pourrait par la suite induire la survenue d'anomalies chromosomiques et l'instabilité génomique.

De façon très intéressante, plusieurs études ont démontré que les mutations somatiques de *POT1* constituent un événement récurrent au cours de la LLC [Fabbri *et al.*, 2011 ; Puente *et al.*, 2011 ; Landau *et al.*, 2013 ; Ramsay *et al.*, 2013]. Ces mutations surviennent préférentiellement dans le domaine de liaison de POT1 à l'ADN télomérique, ce qui génère une dysfonction télomérique. D'après l'analyse de Landau *et al.*, ces mutations

sont initiatrices, c'est-à-dire précoces et spécifiques de la transformation maligne des lymphocytes B ; elles précèdent la sélection d'autres mutations non spécifiques de la LLC et impliquées dans la progression de la maladie, telles que les mutations de *TP53*. La diminution de l'expression de *POT1* peut également favoriser l'activité de la télomérase, qui est normalement régulée négativement par le complexe shelterin selon un modèle de comptage des protéines ; cette régulation est notamment exercée par la protéine *POT1*, soit par occupation de l'extrémité 3' sortante, soit par modifications post-traductionnelles de *POT1*.

L'étude des mutations de *POT1* dans l'ensemble de la série constitue l'une des perspectives de notre travail, afin de préciser une éventuelle relation entre ces mutations, l'expression du gène *POT1*, l'expression de *hTERT* et le statut télomérique. Dans ce sens, il serait également intéressant d'évaluer le profil télomérique en fonction du statut mutationnel des gènes fréquemment mutés dans la LLC -et parfois associés à la présence d'anomalies cytogénétiques récurrentes- tels *NOTCH1*, *SF3B1* ou *BIRC3*. Il a d'ailleurs été récemment démontré par Mansouri *et al.* que les mutations *NOTCH1* et *SF3B1* sont associées au raccourcissement des télomères, tel qu'il est observé au cours des délétions 11q ou 17p [Mansouri *et al.*, 2013].

L'analyse des aberrations cytogénétiques, qui repose en routine sur l'étude du caryotype et la technique de FISH, est à l'heure actuelle l'un des facteurs prédictifs majeurs du pronostic de la LLC. Nous avons souhaité évaluer **la place d'une nouvelle méthode d'exploration du génome, la MLPA, qui permet l'étude simultanée de nombreux déséquilibres à valeur pronostique.**

Nous avons montré qu'il existe une bonne concordance entre la MLPA et la technique de référence, à savoir la FISH. Cette technique constitue une approche intéressante pour la recherche d'anomalies génomiques présentes dans une majorité de cellules malignes, et pourrait à ce titre être utilisée comme méthode de screening du fait de sa rapidité et de son faible coût. L'utilisation de la technique de MLPA a déjà été rapportée par 6 équipes différentes, utilisant pour 5 d'entre elles le kit commercial choisi dans notre étude. Le nombre d'échantillons analysés par ces auteurs est de plus de 350, auxquels nous ajoutons une série de 77 patients. Dans le même ordre d'idée, l'équipe de C. Bastard a rapporté l'utilisation d'une stratégie similaire fondée sur la PCR, la QMPSF (quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments), dans la LLC, les SMD et les lymphomes du manteau [Bastard *et al.*, 2007 ; Jardin *et al.*, 2009 ; Stamatoullas *et al.*, 2012]. L'ensemble de ces travaux démontrent

eux aussi la faisabilité de cette approche de PCR multiplexe comme technique de première intention.

Néanmoins, la capacité de détection des anomalies par la MLPA est limitée par la taille du clone, ce qui constitue un obstacle à son usage exclusif en routine, puisque les profils normaux peuvent correspondre à des faux-négatifs nécessitant d'être vérifiés par FISH. Cet inconvénient est maintenant bien connu, et selon les auteurs, les cellules porteuses d'une anomalie clonale doivent représenter 20 à 40% de l'échantillon [Coll-Mulet *et al.*, 2008 ; Abdool *et al.*, 2010 ; Al Zaabi *et al.*, 2010 ; Fabris *et al.*, 2011]. Cette limite a également été rapportée pour l'usage de la de la QMPSF.

De façon plus originale, notre travail montre que certaines anomalies complexes peuvent être méconnues par la MLPA du fait de la localisation des sondes. Enfin, nous rapportons pour la première fois l'existence de faux-positifs liés soit à la présence de mutations ponctuelles dans le gène *TP53*, soit à un manque de spécificité des sondes de MLPA ciblant le chromosome 19. L'ensemble de ces constatations indiquent que la MLPA ne peut pas remplacer les techniques plus classiques, comme le caryotype et la FISH, mais constitue une approche complémentaire permettant une évaluation simultanée de divers déséquilibres et permettant dans certains cas de mieux apprécier la complexité des déséquilibres observés au caryotype.

Il reste évident que cette approche méconnaît les anomalies équilibrées, notamment les translocations impliquant les gènes des immunoglobulines ; cet inconvénient constitue un autre argument pour l'utilisation de ce type d'approche uniquement en association à la cytogénétique conventionnelle. L'importance de l'identification de ces translocations Ig, et plus largement des anomalies équilibrées, est reflétée par le score pronostique proposé par Haferlach *et al.*, 2010. Cet outil combine l'âge (> ou = 65 ans), le taux de leucocytes (> ou = 20 G/L), le statut IgV_H, la délétion 17p, les translocations Ig et le nombre d'anomalies chromosomiques au caryotype. Le score obtenu permet d'identifier 3 sous-groupes de patients dont la survie globale varie de 94,5% vs 64,3% vs 41,1% à 5 ans. Ceci illustre également l'importance de l'instabilité génomique, appréciée par le nombre d'anomalies caryotypiques.

D'autres équipes ont exploré l'intérêt d'approches alternatives pour l'analyse génomique. La **CGH-array** constitue une méthode séduisante pour l'exploration pangénomique résolutive. En effet, cette approche a permis la mise en évidence d'anomalies récurrentes rares ; elle facilite la description des amplifications et délétions ; elle permet d'évaluer la complexité génomique et l'évolution clonale [Schwaenen *et al.*, 2004 ; Coll-

Mulet Gil *et al.*, 2009 ; Chapiro *et al.*, 2010 ; Rinaldi *et al.*, 2011 ; Brown *et al.*, 2012 ; Rodriguez *et al.*, 2012 ; Mian *et al.*, 2013]. Cependant, comme pour la recherche d'anomalies constitutionnelles, la qualité de l'ADN est un élément déterminant. La taille du clone aberrant est également critique, puisque les déséquilibres sont mis en évidence de façon fiable lorsqu'ils concernent plus de 30% des cellules de l'échantillon ; entre 10% et 30% de cellules porteuses de gains ou de pertes, les variations du nombre de copies ne sont pas toujours détectées. De plus, la CGH-array classique ne permet pas de visualiser les anomalies équilibrées. Cependant, la combinaison des technologies de micro-array et d'amplification linéaire multiplexe de l'ADN, nommée « translocation-CGH », permet de façon prometteuse la mise en évidence simultanée de variations du nombre de copies et de multiples translocations réciproques équilibrée, jusqu'à 128 dans le travail rapporté par Schultz *et al.*, 2011.

Plus récemment, le développement du **séquençage haut-débit ou NGS** (Next Generation Sequencing) a permis la description des mutations récurrentes de la LLC. Cette méthodologie, initialement très coûteuse, permet désormais de séquencer un génome humain en quelques jours pour un coût de plus en plus raisonnable. Il est probable que dans un avenir proche, les techniques classiques, caryotype et FISH, soit conjuguées aux résultats de NGS lors de l'évaluation des anomalies génomiques des patients atteints de LLC. Ceci est illustré par le travail de Rossi *et al.*, qui propose un algorithme pronostique intégrant les anomalies mutationnelles et cytogénétiques [Rossi *et al.*, 2013]. Cet outil permet de définir 4 groupes de patients : *i/* les patients à haut-risque, présentent une anomalie de *TP53* ou de *BIRC3* (survie à 10 ans : 29%) ; *ii/* les patients de risque intermédiaire, porteurs de mutations *NOTCH1* ou *SF3B1* et/ou de délétion 11q22-23 (survie à 10 ans : 37%) ; *iii/* les patients de faible risque, avec trisomie 12 ou cytogénétique normale (survie à 10 ans : 57%) ; *iv/* les patients de très faible risque, avec délétion 13q isolée (survie à 10 ans : 69,3%). Cet algorithme améliore de façon significative la stratification pronostique fondée sur la cytogénétique seule.

Enfin, des **approches fonctionnelles** ont été proposées pour compléter l'analyse des anomalies génomiques de *TP53*. Ces tests présentent également l'intérêt théorique de pouvoir détecter des dysfonctions de la voie p53 en l'absence de mutation, liées par exemple à des modifications épigénétiques ou à des modifications post-traductionnelles. L'une des stratégies est fondée sur la cytométrie en flux et évalue les niveaux de p53 et P21 avant et après exposition à l'étoposide ; différents profils de réponse anormale ont été décrits, correspondant à différents type de mutations (faux-sens, codon stop ou variant d'épissage) [Lagarff-Tavernier *et al.*, 2011]. L'autre stratégie utilise la RT-PCR pour évaluer les niveaux

d'expression de *TP53* et *P21* après irradiation [Mohr *et al.*, 2011]. Afin de préciser la place de ces tests dans la prise en charge des patients, notre équipe participe actuellement à l'étude de la corrélation entre statut mutationnel, anomalies cytogénétiques et test fonctionnel par cytométrie en flux dans le cadre du protocole ICLL01-BOMP (Pr O. Tournilhac – Dr S. De Guibert).

Enfin, il serait nécessaire de poursuivre ce travail par une étude de la survie sans progression et de la survie sans traitement des patients répartis selon leurs paramètres télomériques, leurs données cytogénétiques et leur statut mutationnel (incluant les gènes *TP53*, *ATM*, *NOTCH1* et *SF3B1*) ; cette approche pourrait permettre de préciser la place de l'évaluation de la dysfonction télomérique dans la détermination du pronostic des patients et dans la prise en charge thérapeutique.

V- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abdool A, Donahue AC, Wohlgemuth JG, Yeh CH. Detection, analysis and clinical validation of chromosomal aberrations by multiplex ligation-dependent probe amplification in chronic leukemia. *PLoS One* 2010;5(10): e15407

Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000; 96: 2240-5

Aloni-Grinstein R, Zan-Bar I, Alboum I, Goldfinger N, and Rotter V. Wild type p53 functions as a control protein in the differentiation pathway of the B-cell lineage. *Oncogene* 1993; 8: 3297-3305

Al Zaabi EA, Fernandez LA, Sadek IA et al Multiplex ligation-dependent probe amplification versus multiprobe fluorescence in situ hybridization to detect genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia: a tertiary center experience. *J Mol Diagn* 2010; 12: 197–203

Aqeilan RI, Calin GA, Croce CM. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ* 2010; 17(2): 215-20

Augereau A, T'kint de Roodenbeke C, Simonet T et al. Telomeric damage in early stage of chronic lymphocytic leukemia correlates with shelterin dysregulation. *Blood* 2011; 118: 1316-22

Austen B, Powell JE, Alvi A et al. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood* 2005; 106:3175-82

Austen B, Skowronska A, Baker C et al. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5448–5457

B

Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A et al. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* 2012; 119: 329-31

Bae J, Leo CP, Hsu SY, Hsueh AJ. Mcl-1S, a splicing variant of the antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J Biol Chem* 2000; 275: 25255-261

Bairey O, Boycov, Kaganovsky E et al. All three receptors for vascular endothelial growth factor are expressed on B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia Research* 2004; 28: 243–248

Bairey O, Zimra Y, Shaklai M, Rabizadeh E. BCL-2 expression correlates positively with serum basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 113: 400-6

Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003; 421: 499-506

Barak Y, Juven T, Haffner R, and Oren M. MDM2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO* 1993; 12: 461-468

Bastard C, Raux G, Fruchart C et al. Comparison of a quantitative PCR method with FISH for the assessment of the four aneuploidies commonly evaluated in CLL patients. *Leukemia* 2007; 21: 1460-3

Baumann P, Cech TR. Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* 2001; 292: 1171-75

Baur JA, Zou Y, Shay JW, Wright WE. Telomere position effect in human cells. *Science* 2001; 292: 2075-2077

Bechter OE, Eisterer W, Pall G et al. Telomere length and telomerase activity predict survival in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 1998; 58: 4918-4922

Bernal A, Pastore RD, Asgary Z, et al. Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* 2001; 98: 3050-7

Bilous N, Abramenko I, Chumak A et al. Analysis of TP53 Codon72, and p21 Codon31 Polymorphisms in CLL Patients Exposed to Ionizing Radiation Due to the Chernobyl NPP Accident Blood. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2012; 120: 4580

Bingle CD, Craig RW, Swales BM et al. Exon skipping in Mcl-1 results in a Bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J Biol Chem* 2000; 275: 22136-146

Biondi A, Rossi V, Barbui T et al. Constitutive expression of the interleukin-6 gene in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1989; 73: 1279-84

Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001; 106: 661-73

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279:349-52

Boggs, D.R., Chen, S.C., Zhang, Z.N. and Zhang, A. Chronic lymphocytic leukemia in China. *Am J Hematol* 1987; 25: 349-354

Bond JA, Wyllie FS, Wynford-Thomas D. Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53. *Oncogene* 1994; 9: 1885-9

Borsellino N, Belldegrun A, Bonavida B. Endogenous interleukin 6 is a resistance factor for cis-diamminedichloroplatinum and etoposide-mediated cytotoxicity of human prostate carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1995; 55: 4633-4639

Bosanquet, A.G., Sturm I, Wieder T et al. Bax expression correlates with cellular drug sensitivity to doxorubicin, cyclophosphamide and chlorambucil but not fludarabine, cladribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 1035-1044

Böttcher S, Ritgen M, Fischer K et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J Clin Oncol* 2012; 30(9): 980-8

Britt-Compton B, Lin TT, Ahmed G et al. Extreme telomere erosion in ATM-mutated and 11q-deleted CLL patients is independent of disease stage. *Leukemia* 2012; 26(4): 826-30

Brocke-Heidrich K, Kretzschmar AK, Pfeifer G et al. Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a BCL-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood* 2004; 103: 242-251

Brosh, R. & Rotter, V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature Reviews Cancer* 2009; 9: 701–713

Brown JR, Hanna M, Tesar B et al. Integrative Genomic Analysis Implicates Gain of PIK3CA at 3q26 and MYC at 8q24 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 3791-802

Brugat T, Nguyen-Khac F, Grelier A et al. Telomere dysfunction-induced foci arise with the onset of telomeric deletions and complex chromosomal aberrations in resistant chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2010; 116: 239-49

Bryan TM, Cech TR. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 318-24

Bullrich F, Rasio D, Kitada S et al: ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Res* 59; 24-27: 1999

Bulian P, Rossi D, Forconi F, et al. IGHV gene mutational status and 17p deletion are independent molecular predictors in a comprehensive clinical-biological prognostic model for overall survival prediction in chronic lymphocytic leukemia. *J Transl Med* 2012; 10: 18

Bunch, J.T., Bae, N.S., Leonardi, J. and Baumann, P. Distinct requirements for Pot1 in limiting telomere length and maintaining chromosome stability. *Mol. Cell. Biol* 2005; 25: 5567–5578

Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* 1999; 94: 3658-67

Buscemi G, Zannini L, Fontanella E et al. The shelterin protein TRF2 inhibits Chk2 activity at telomeres in the absence of DNA damage. *Curr Biol* 2009; 19: 874-9

C

Callet-Bauchu E, Rimokh R, Tigaud I et al. dic(4;17)(p11;p11): a new recurrent chromosomal abnormality in chronic B-lymphoid disorders. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 17: 185–90

Capalbo, S., Trerotoli, P., Ciancio, A. et al. Increased risk of lymphoproliferative disorders in relatives of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relevance of the degree of familial linkage. *Eur J Haematol* 2000; 65: 114-117

Cavalli F., Isaacson P.G., Gascoyne R.D. and Zucca E. MALT Lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2001; 241-258

Cavazzini F, Hernandez JA, Gozzetti A et al. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br J Haematol* 2008;142: 529-37

Cavazzini F, Rizzotto L, Sofritti O et al. Clonal evolution including 14q32/IGH translocations in chronic lymphocytic leukemia: analysis of clinicobiologic correlations in 105 patients. *Leuk Lymphoma* 2012; 53: 83-8

Celli G, de Lange T. DNA processing not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat. Cell Biol* 2005 7: 712–18

Chao JR, Wang JM, Lee SF et al. Mcl-1 is an immediate-early gene activated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) signaling pathway and is one component of the GM-CSF viability response. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 4883-4898

Chapiro E, Leporrier N, Radford-Weiss I et al. Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated Chronic Lymphocytic Leukemia at advanced stages. *Leuk Res* 2010; 34: 63-8

Chen H, Treweek AT, West DC et al. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2000; 96: 3181-7

Chen Y, Yang Y, van Overbeek M et al. A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins. *Science* 2008; 319:1092–96

Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352: 804-15

Churikov D., Wei C. and Price C.M. Vertebrate POT1 restricts Overhang length and prevents activation of a telomeric DNA damage checkpoint but is dispensable for overhang protection. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 6971–6982

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M et al. miR15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 13944-13949

Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med* 2013; 273: 114-27

Coll-Mulet L, Santidrian AF, Cosialls AM et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of genomic alterations in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2008; 142: 793–801

Coll-Mulet L, Gil J. Genetic alterations in chronic lymphocytic leukaemia. *Clin Transl Oncol* 2009; 11: 194-8

Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK et al. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res.* 2007; 67: 8433-8

Crabbe L, Verdun RE, Haggblom CI, Karlseder J. Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science* 2004; 306: 1951-3

Craig RW. Mcl-1 provides a window on the role of the Bcl2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* 2002; 16: 444-454

Crespo M, Bosch F, Villamor N et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 1764-1775

D

D'Adda di Fagagna F, Hande MP, Tong WM et al. Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. *Curr Biol* 2001; 11: 1192-6

D'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003; 426: 194-8

Dameron K.M., Volpert O.V., Tainsky M.A., and Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1582-1584

Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P et al. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J* 2001; 20: 6958–68

Damle RN, Wasil T, Fais F et al. Immunoglobulin V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1999; 94: 1840-1847

Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F et al. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by Ig V gene mutations. *Blood* 2004; 103: 375–382

Damle RN, Temburni S, Banapour T et al. T-cell independent, B-cell receptor-mediated induction of telomerase activity differs among IGHV mutation-based subgroups of chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* 2012; 120: 2438-49

Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L et al. CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 2005; 105: 3042-50

Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S et al. In-tandem insight from basic science combined with clinical research: CD38 as both marker and key component of the pathogenetic network underlying chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 108: 1135-44

Deffie A, Wu H, Reinke V, and Lozano G. The tumor suppressor p53 regulates its own transcription. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 3415-3423

De Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Dev* 2005; 19: 2100-2110

Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavourable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica*. 2012; 97(3): 437-41

Delgado J, Salaverria I, Lee E et al. Detailed Molecular Analysis of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Carrying 17p Deletions Reveals Concurrent Abnormalities with Prognostic Impact ASH Annual Meeting Abstracts 2012; 120: 4577

Demers G.W., Foster S.A., Halbert C.L., and Galloway D.A. Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; U.S: 91, 4382-6

Dicker F, Herholz H, Schnittger S et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2009; 23: 117-24

Dierlamm J, Wlodarska I, Michaux L et al. FISH identifies different types of duplications with 12q13-15 as the commonly involved segment in B-cell lymphoproliferative malignancies characterized by partial trisomy 12. *Genes, chromosomes & cancer* 1997; 20: 155-166

Dimitrova N, de Lange T. Cell cycle-dependent role of MRN at dysfunctional telomeres: ATM signalling dependent induction of nonhomologous end joining (NHEJ) in G1 and resection-mediated inhibition of NHEJ in G2. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 5552-63

Diotti R and Loayza D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus* 201; 2: 119-35

Dohner H, Fischer K, Bentz M et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 1995; 85:1580-9

Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1910-1916

Domina AM, Vrana JA, Gregory MA et al. MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* 2004; 23: 5301-15

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; 356: 215-221

Dong HJ, Fang C, Fan L et al. MDM2 promoter SNP309 is associated with an increased susceptibility to chronic lymphocytic leukemia and correlates with MDM2 mRNA expression in Chinese patients with CLL. *Int J Cancer*. 2012; 130: 2054-61

Doubek M, Mayer J, Obrtlíková P et al. Modern and conventional prognostic markers of chronic lymphocytic leukaemia in the everyday haematological practice. *Eur J Haematol* 2011; 87: 130-7

Dregalla RC, Zhou J, Idate RR et al. Regulatory roles of tankyrase 1 at telomeres and in DNA repair: suppression of T-SCE and stabilization of DNA-PKcs. *Aging* 2010; 2: 691-708

Dreger P, Schnaiter A, Zenz T et al. TP53, SF3B1, and NOTCH1 mutations and outcome of allotransplantation for chronic lymphocytic leukemia: six-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood* 2013;121:3284-8

Dubost JJ, Rolhion C, Tchirkov A et al. Interleukin-6-producing cells in a human glioblastoma cell line are not affected by ionizing radiation. *J Neurooncol* 2002; 56: 29-34

Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* 2000; 26: 447-50

Dynek JN, Smith S. Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis. *Science* 2004; 304: 97-100

E

Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G et al. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107: 885–891

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-825

El Rouby S, Thomas A, Costin D et al. p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood* 1993; 82: 3452-3459

F

Fabbri M, Bottoni A, Shimizu M et al. Association of a microRNA/TP53 feedback circuitry with pathogenesis and outcome of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *JAMA* 2011; 305: 59-67

Fabris S, Scarciolla O, Morabito F et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization to detect chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: a comparative study. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50: 726-34

Farr C, Fantes J, Goodfellow P, Cooke H. Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 7006–10

Fayad L, Cabanillas F, Talpaz M et al. High serum interleukin-6 levels correlate with a shorter failure-free survival in indolent lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1998; 30: 563-571

Fayad L, Keating MJ, Reuben J et al. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukaemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood* 2001; 97: 256-263

Fedorchenko O, Stiefelhagen M, Peer Zada AA et al. CD44 regulates the apoptotic response and promotes disease development in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; 121: 4126-36

Fenaux P, Preudhomme C, Lai JL, et al. Mutations of the p53 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a report on 39 cases with cytogenetic analysis. *Leukemia* 1992; 6: 246-250

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2413

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-76

Feuerhahn S, Iglesias N, Panza A et al. TERRA biogenesis, turnover and implications for function, *FEBS Lett* 2010; 584: 3812–3818

Fischer K, Cramer P, Busch R et al. Bendamustine combined with rituscimab in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia multicenter phase 2 trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3559-3566

Freeman GJ, Freedman AS, Rabinowe SN et al. Interleukin 6 gene expression in normal and neoplastic B cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1512-8

Froelich-Ammon S.J., Dickinson B.A., Bevilacqua J.M. et al. Modulation of telomerase activity by telomere DNA-binding proteins in *Oxytricha*. *Genes Dev* 1998; 12: 1504–1514

Fujise K, Zhang D, Liu J, Yeh ET. Regulation of apoptosis and cell cycle progression by Mcl-1. Differential role of Proliferating Cell Nuclear Antigen. *J Biol Chem* 2000; 275: 39458-65

G

Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88: 5413-5417

Gall JG. Beginning of the end: origins of the telomere concept, in: E.H. Blackburn, C.W. Greider (Eds.), *Telomeres*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 1995, pp. 1–10

Garg R, Wierda W, Ferrajoli A et al. The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2012;118: 3531-7

Garzon R, Heaphy CE, Havelange V et al. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood* 2009; 114: 5331-41

Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins BCL-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998 (a); 273: 13313-6

Gerber HP, Ferrara N. The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis, *The Journal of Molecular Medicine* 2003; 81: 20-31

Gerber HP, Malik AK, Solar GP et al. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 2002; 417: 954-958

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998 (b); 273: 30336-43

Ghia P, Circosta P, Scielzo C et al. Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 294: 135-45

Gong Y, De Lange T. A Shld1-controlled POT1a provides support for repression of ATR signaling at telomeres through RPA exclusion. *Mol Cell* 2010; 40: 377-87

Gonzalez D, Martinez P, Wade R et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2223-9

Gonzalez D, Else M, Wren D et al. CLLU1 expression has prognostic value in CLL after first-line therapy in younger patients and those with mutated IGHV genes. *Haematologica* 2013; 98: 274-8

Grabowski P, Hultdin M, Karlsson K et al. Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. *Blood* 2005; 105: 4807-12

Granziero L, Ghia P, Circosta P et al. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 2001; 97: 2777-83

Grever MR, Lucas DM, Dewald GW et al. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol* 2007; 25: 799-804

Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999; 97: 503-14

Grossmann V, Kohlmann A, Schnittger S et al. Acquisition of TP53 Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Patients During the Course of Disease Is Associated with an Unmutated IGHV Status and Mutations in XPO1 and SF3B1. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2012; 120: 1768

Gudkov AV, Komarova EA. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(2): 117-129

H

Haferlach C, Dicker F, Schnittger S et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia* 2007; 21: 2442-51

Haferlach C, Dicker F, Weiss T et al. Toward a comprehensive prognostic scoring system in chronic lymphocytic leukemia based on a combination of genetic parameters. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; 49: 851-9

Haglund U, Juliusson G, Stellan B, Gahrton G. Hairy cell leukemia is characterized by clonal chromosome abnormalities clustered to specific regions. *Blood* 1994; 83: 2637-45

Hallek M, Langenmayer I, Nerl C et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 93: 1732-1737

Hallek M, Cheson BD, Catovsky D et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111 (12): 5446-56. Erratum in: *Blood*. 2008; 112 (13): 5259

Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010; 376: 1164-1174

Hallek M, Schmitt B, Wilhelm M et al. Fludarabine plus cyclophosphamide is an efficient treatment for advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL): results of a phase II study of the German CLL Study Group. *Br J Hematol* 2001; 114: 342-348

Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A et al. Unmutated Ig V (H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1999; 94: 1848-1854

Hanada M, Delia D, Aiello A et al. Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1993; 82: 1820-8

Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G et al. Interleukin-6 type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998; 334: 297-314

Heintel D, Kroemer E, Kienle D et al. High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA is associated with unmutated IGVH gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2004; 18: 756-62

Hemann MT, Greider CW. G-strand overhangs on telomeres in telomerase-deficient mouse cells. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 3964-69

Herling M, Patel KA, Weit N et al. High TCL1 levels are a marker of B-cell receptor pathway responsiveness and adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; 114: 4675-86

Hermeking H. p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell*. 2007; 12: 414-418

Hickson ID. RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 169-78

Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004; 104: 607-18

Hockemeyer D., Sfeir A.J., Shay J.W. et al. POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end. *EMBO J* 2005; 24: 2667–2678

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 549-80

Hsu HL, Gilley D, Blackburn EH, Chen DJ. Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 12454-8

Hsu HL, Gilley D, Galande SA et al. Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev* 2000; 14: 2807-12

Hu WG, Li JW, Feng B et al. Vascular endothelial growth factors C and D represent novel prognostic markers in colorectal carcinoma using quantitative image analysis. *Eur Surg Res* 2007; 39: 229-38

Huber S, Oelsner M, Decker T et al. Sorafenib induces cell death in chronic lymphocytic leukemia by translational downregulation of Mcl-1. *Leukemia*. 2011; 25: 838-47

I

Ibrahim S, Keating M, Do KA et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 2001; 98: 181-186

Igarashi H, Sakaguchi N. Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. *Blood* 1997; 89: 1299-1307

Inuzuka H, Shaik S, Onoyama I et al. SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature* 2011; 471: 104-9

Inoshita S, Takeda K, Hatai T et al. Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukaemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 2002; 277: 43730-734

Isomoto H, Kobayashi S, Werneburg NW et al. Interleukin-6 upregulates myeloid cell leukaemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2005; 42: 1329-38

J

Jacks T, Remington L, Williams BO et al. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 1994; 4: 1-7

Jardin F, Picquenot JM, Parmentier F et al. Detection of gene copy number aberrations in mantle cell lymphoma by a single quantitative multiplex PCR assay: clinicopathological relevance and prognosis value. *Br J Haematol*. 2009; 146: 607-18

Johnson GG, Sherrington PD, Carter A et al. A novel type of p53 pathway dysfunction in chronic lymphocytic leukemia resulting from two interacting single nucleotide polymorphisms within the p21 gene. *Cancer Res* 2009; 69: 5210-7

Jourdan M, Veyrune JL, De Vos J, Redal N, Couderc G, Klein B. A major role for Mcl-1 antiapoptotic protein in the IL-6-induced survival of human myeloma cells. *Oncogene* 2003; 22: 2950-9

Juliussen G, Oscier DG, Fitchett M et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 1990; 323: 720–724

K

Kalla C, Scheuermann MO, Kube I et al. Analysis of 11q22-q23 deletion target genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: evidence for a pathogenic role of NPAT, CUL5, and PPP2R1B. *Eur J Cancer* 2007; 43: 1328-35

Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 2000; 19(49): 5598-605

Karlseder J, Broccoli D, Dai Y et al. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 1999; 283: 1321-5

Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 1992; 71: 587-597

Kato S, Han SY, Liu W et al. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by highresolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 8424-8429

Keating MJ, O'Brien S, Kontoyiannis DP et al. Results of first salvage therapy for patients refractory to a fludarabine regimen in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 2002 (a); 43: 1755–1762

Keating MJ, Flinn I, Jain V et al. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood* 2002 (b); 99: 3554–3561

Kelleher C, Kurth I, Lingner J. Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity in vitro. *Mol. Cell Biol* 2005; 25: 808–18

Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 10705-9

Kern C, Cornuel JF, Billard C et al. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood* 2004; 103: 679-88

Khodabakhshi AH, Morin RD, Fejes AP et al. Recurrent targets of aberrant somatic hypermutation in lymphoma. *Oncotarget* 2012; 3: 1308-19

Kibe T, Osawa GA, Keegan CE, de Lange T. Telomere protection by TPP1 is mediated by POT1a and POT1b. *Mol Cell Biol* 2010; 30: 1059-66

Kim KJ, Li B, Winer J et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993; 362: 841-4

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer, *Science* 1994; 266: 2011–2015

Kirkpatrick KL, Clark G, et al. hTERT mRNA expression correlates with telomerase activity in human breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29(4): 321-6

Kishi S, Zhou XZ, Ziv Y et al. Telomeric protein Pin2/TRF1 as an important ATM target in response to double strand DNA breaks. *J Biol Chem* 2001; 276: 29282-91

Kitada S, Andersen J, Akar S et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukaemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood* 1998; 91: 3379-89

Kipling D, Faragher RG. Progeroid syndromes: probing the molecular basis of aging? *Mol Pathol* 1997; 50: 234-41

Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001; 194: 1625–38

Koller C, Bekele BN, Zhou X et al. Plasma thrombopoietin compared with immunoglobulin heavy-chain mutation status as a predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 108: 1001-6

Kozopas KM, Yang T, Buchan HL et al. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3516-3520

Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 1999; 341: 1520–9

Kurzrock R, Redman J, Cabanillas F et al. Serum interleukin 6 levels are elevated in lymphoma patients and correlate with survival in advanced Hodgkin's disease and with B symptoms. *Cancer Res* 1993; 53: 2118-2122

Kyo S, Takakura M, Taira T et al. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucl Acids Res* 2000; 28: 669-677

L

- Lai R, O'Brien S, Maushouri T et al. Prognostic value of plasma interleukin-6 levels in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer* 2002; 95: 1071-1075
- Lam YC, Akhter S, Gu P et al. SNMIB/Apollo protects leading-strand telomeres against NHEJ-mediated repair. *EMBO* 2010; 29: 2230-41
- Lanza L, Scudeletti M, Meazza R, *et al.* Induction of apoptosis in human melanoma cell lines by taxol and IL-6 antisense oligonucleotides. *Am Ass Cancer Res Proc* 1999; abstract 3219, p487
- Laoutaris N, Karlsson K, Baran-Marzszak F et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* 2008; 111: 1524-1533
- Lavabre-Bertrand T, Exbrayat C, Liautard J et al. Detection of membrane and soluble interleukin-6 receptor in lymphoid malignancies. *Br J Haematol* 1995; 91: 871-7
- Lazzerini Denchi E, de Lange T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* 2007; 448: 1068-71
- Lee YK, Bone ND, Strege AK et al. VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004; 104: 788-94
- Lee YK, Shanafelt TD, Bone ND et al. VEGF receptors on chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells interact with STAT 1 and 3: implication for apoptosis resistance. *Leukemia* 2005; 19: 513-23
- Le Gouill S, Podar K, Amiot M et al. VEGF induces Mcl-1 upregulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Blood* 2004; 104: 2886-92
- Lei M, Podell ER, Cech TR. Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 1223–29
- Lenain C, Bauwens S, Amiard S et al. The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair. *Curr Biol* 2006; 16: 1303-10
- Lens D, De Schouwer PJ, Hamoudi RA et al. p53 abnormalities in B-cell prolymphocytic leukemia. *Blood* 1997; 89: 2015-2023
- Leu CM, Wong FH, Chang C et al. Interleukin-6 acts as an antiapoptotic factor in human esophageal carcinoma cells through the activation of both STAT3 and mitogen-activated protein kinase pathways. *Oncogene* 2003; 22(49): 7809-18
- Li B, Oestreich S, De Lange T. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* 2000; 101: 471–83

Li B, Jog SP, Reddy S, Comai L. WRN controls formation of extrachromosomal telomeric circles and is required for TRF2DeltaB-mediated telomere shortening. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 1892-904

Lin K, Lane B, Carter A et al. The gene expression signature associated with TP53 mutation/deletion in chronic lymphocytic leukaemia is dominated by the under-expression of TP53 and other genes on chromosome 17p. *Br J Haematol* 2013; 160: 53-62

Lin K, Sherrington PD, Dennis M et al. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgVH mutation in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 2002; 100: 1404-09

Lin TT, Letsolo BT, Jones RE et al. Telomere dysfunction and fusion during the progression of chronic lymphocytic leukemia: evidence for a telomere crisis. *Blood* 2010; 116: 1899-907

Lin SY, Liang Y, Li K. Multiple roles of BRIT1/MCPH1 in DNA damage response, DNA repair and cancer suppression. *Yonsei Med J* 2010; 51: 295-301

Loayza D, Parsons H, Donigian J et al. DNA binding features of human POT1: a nonamer 5_-TAGGGTTAG-3_ minimal binding site, sequence specificity, and internal binding to multimeric sites. *J. Biol. Chem* 2004; 279: 13241-48

Longo PG, Laurenti L, Gobessi S et al. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2008; 111: 846-855

López C, Delgado J, Costa D et al. Different distribution of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012; 51(9): 881-9

Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW et al. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood* 2004; 103: 3278-3281

Lu C, Sheehan C, Rak JW, Chambers CA, Hozumi N, Kerbel RS. Endogenous interleukin 6 can function as an *in vivo* growth-stimulatory factor for advanced-stage human melanoma cells. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1417-1425

M

Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 1997; 88: 657-66

Malcikova J, Smardova J, Rocnova L et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: Selection, impact on survival and response to DNA-damage. *Blood* 2009; 114: 5307-5314

Mansouri L, Grabowski P, Degerman S et al. Short telomere length is associated with NOTCH1/SF3B1/TP53 aberrations and poor outcome in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia patients. *Am J Hematol*. 2013 Apr 26 [Epub ahead of print]

Martens UM, Brass V, Sedlacek L et al. Telomere maintenance in human B lymphocytes. *Br J Haematol* 2002; 119: 810-818

Mason KD, Khaw SL, Rayeroux KC et al. The BH3 mimetic compound, ABT-737, synergizes with a range of cytotoxic chemotherapy agents in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2009; 23: 2034-41

Mayr C, Speicher MR, Kofler DM et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107: 742–751

Messmer BT, Messmer D, Allen SL et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005; 115 : 755-64

Mian M, Rinaldi A, Mensah AA et al. Large genomic aberrations detected by SNP array are independent prognosticators of a shorter time to first treatment in chronic lymphocytic leukemia patients with normal FISH. *Ann Oncol.* 2013; 24: 1378-84

Millauer B, Shawver LK, Plate KH et al. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 1994; 367: 576-9

Michels J, Johnson PWM, Packham G. Molecules in focus: Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 267-271

Milot E, Fotouhi-Ardakani N, Filep JG. Myeloid nuclear differentiation antigen, neutrophil apoptosis and sepsis. *Front Immunol* 2012; 3: 397

Milot E, Filep JG. Regulation of neutrophil survival/apoptosis by Mcl-1. *ScientificWorldJournal* 2011; 11: 1948-62

Fotouhi-Ardakani N, Kebir DE, Pierre-Charles N, Wang L, Ahern SP, Filep JG, Milot E. Role for myeloid nuclear differentiation antigen in the regulation of neutrophil apoptosis during sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 182: 341-50

Mitzutani Y, Bonavida B, Koishihara Y et al. Sensitization of human renal cell carcinoma cells to cis-diamminedichloroplatinum (II) by anti-interleukin 6 monoclonal antibody or anti-interleukin 6 receptor monoclonal antibody. *Cancer Res* 1995; 55: 590-596

Miyashita T and Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293-299

Mohr J, Helfrich H, Fuge M et al. DNA damage-induced transcriptional program in CLL: biological and diagnostic implications for functional p53 testing. *Blood* 2011; 117: 1622-32

Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 1989; 59: 521-529

Moreno A, Villar ML, Cámara C et al. Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Blood* 2001; 97: 242-249

Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 2007; 26: 6133-40

Muller H, Takeshita M, Krause J et al. Immunohistochemical in situ demonstration of cytokines in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1992; 76: 164-168

Myung K, Ghosh G, Fattah FJ et al. Regulation of telomere length and suppression of genomic instability in human somatic cells by Ku86. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 5050-9

N

Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 716-21

Nguyen-Khac F, Chapiro E, Lesty C et al. Specific chromosomal IG translocations have different prognoses in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Blood Res* 2011; 1: 13-21

Niedernhofer LJ, Garinis GA, Raams A et al. A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis. *Nature* 2006; 444: 1038-43

Nijhawan D, Fang M, Traer E et al. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 2003; 17: 1475-1486

Nor JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of BCL-2 expression. *Am J Pathol* 1999; 154(2): 375-84

O

O'Brien SM, Kantarjian HM, Cortes J et al. Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1414-1420

Olsson A, Norberg M, Okvist A et al. Upregulation of bfl-1 is a potential mechanism of chemoresistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer* 2007; 97: 769-777

Opferman JT, Letai A, Beard C et al. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic Mcl-1. *Nature* 2003; 426: 671-676

Oppezso P, Vasconcelos Y, Settegrana C et al. The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005; 106: 650-7

Opresko PL, Von Kobbe C, Laine JP et al. Telomere binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J Biol Chem* 2002; 277: 41110-9

Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004; 363: 105-11

Oren M, Rotter V. Introduction: p53--the first twenty years. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55(1): 9-11

Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002;100: 1177–84

Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* 2013; 121: 468-75

Ouillet P, Fossum S, Parkin B et al. Aggressive chronic lymphocytic leukemia with elevated genomic complexity is associated with multiple gene defects in the response to DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 835-47

Ouillet P, Collins R, Shakhani S et al. The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 6778-90

P

Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* 2005; 114: 441-9

Paesler J, Gehrke I, Gandhirajan RK et al. The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors vatalanib and pazopanib potently induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3390-8

Palm W, De Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet.* 2008; 42: 301-34

Pedersen IM, Kitada S, Leoni LM et al. Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood* 2002; 100: 1795-1801

Pekova S, Mazal O, Cmejla R et al. A comprehensive study of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia: analysis of 1287 diagnostic and 1148 follow-up CLL samples. *Leuk Res* 2011; 35: 889-898

Peller S, Rotter V. TP53 in hematological cancer: low incidence of mutations with significant clinical relevance. *Hum Mutat* 2003; 21: 277-284

Pepper C, Majid A, Lin TT et al. Defining the prognosis of early stage chronic lymphocytic leukaemia patients. *Br J Haematol* 2012; 156: 499-507

Pepper C, Bentley P, Hoy T. Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B-cell chronic lymphocytic leukaemia; *Br J Haematol* 1996; 95:513-7

Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow US et al. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 1997; 150: 815-21

Petitjean A, Mathe E, Kato S et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007; 28: 622-9

Petlickovski A, Laurenti L, Xiaoping L et al. Sustained signalling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukaemia B cells. *Blood* 2005; 105: 4820-27

Puente XS, Pinyol M, Quesada V et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011; 475: 101-5

Put N, Van Roosbroeck K, Konings P et al. Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia with MYC translocations: a subgroup with an aggressive disease course. *Ann Hematol* 2012; 91: 863-873

Put N, Konings P, Rack K et al. Improved detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia by conventional cytogenetics using CpG oligonucleotide and interleukin- 2 stimulation: A Belgian multicentric study. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48: 843–853

Puthier D, Bataille R, Amiot M. IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur J Immunol* 1999 (a); 29: 3945-50

Puthier D, Derenne S, Barille S et al. Mcl-1 and BCL-xL are co-regulated by IL-6 in human myeloma cells. *Br J Haematol* 1999 (b); 107(2): 392-5

Q

Quesada V, Conde L, Villamor N et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2011; 44: 47-52

R

Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219–234

Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1750–1757

Rampazzo E, Bonaldi L, Trentin L et al. Telomere length and telomerase levels delineate subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia with different biological characteristics and clinical outcomes. *Haematologica* 2012; 97: 56-63

Ramsay AJ, Quesada V, Foronda M et al. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2013; 45: 526-30

Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351: 893–901

Raveche ES, Salerno E, Scaglione BJ et al. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. *Blood* 2007; 109: 5079-86

Reynolds JE, Yang T, Qian L et al. Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1994; 54: 6348-6352

Ribatti D, Vacca A, Nico B et al. Angiogenesis spectrum in the stroma of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. An immunohistochemical and ultrastructural study. *Eur J Haematol* 1996; 56: 45-53

Ricca I, Rocci A, Drandi D et al. Telomere length identifies two different prognostic subgroups among VH-unmutated B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia* 2007; 21: 697-705

Rinaldi A, Mian M, Kwee I et al. Genome-wide DNA profiling better defines the prognosis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2011; 154: 590-9

Rinkenberger JL, Horning S, Klocke B et al. Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes and Development* 2000; 14: 23-27

Rodríguez AE, Robledo C, García JL et al. Identification of a novel recurrent gain on 20q13 in chronic lymphocytic leukemia by array CGH and gene expression profiling. *Ann Oncol* 2012; 23: 2138-46

Roos G, Kröber A, Grabowski P et al. Short telomeres are associated with genetic complexity, high-risk genomic aberrations, and short survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 111: 2246-52

Rose-Zerilli M, Forster J, Parker H et al. The Correlation Between Deletion Architecture, ATM Mutational Status and BIRC3 Disruption in 11q-Deleted CLL Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2012; 120: 658

Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194: 1639-47

Rossi D, Lobetti Bodoni C, Genuardi E et al. Telomere length is an independent predictor of survival, treatment requirement and Richters syndrome transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2009; 23: 1062-1072

Rossi D, Bruscaggin A, Spina V et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* 2011; 118: 6904-8

Rossi D, Fangazio M, Rasi S et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; 119: 2854-62

Rossi D, Rasi S, Spina V et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; 121: 1403-12

S

- Saeboe-Larssen S, Fossberg E et al. Characterization of novel alternative splicing sites in human telomerase reverse transcriptase (hTERT): analysis of expression and mutual correlation in mRNA isoforms from normal and tumour tissues. *BMC Mol Biol* 2006; 7: 26
- Sah VP, Attardi LD, Mulligan GJ et al. A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nat. Genet* 1995; 10: 175-180
- Saharia A, Teasley DC, Duxin JP et al. FEN1 ensures telomere stability by facilitating replication fork re-initiation. *J Biol Chem* 2010; 285: 27057-66
- Savage S.A., Bertuch A.A. The genetics and clinical manifestations of telomere biology disorders, *Genet. Med.: Off. J. Ame. Coll. Med. Genet.* 2010; 12: 753–764
- Saxena A, Viswanathan S, Moshynska O et al. Mcl-1 and Bcl-2 /Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Am J Hematol* 2004; 75: 22-33
- Scala G, Quinto I, Ruocco MR, Arcucci A, Mallardo M, Caretto P, Forni G, Venuta S. Expression of an exogenous interleukin 6 gene in human Epstein Barr virus B cells confers growth advantage and in vivo tumorigenicity. *J Exp Med* 1990; 172: 61-68
- Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA et al. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B–cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 748–53
- Schaper F, Gendo C, Eck M et al. Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem J* 1998; 335: 557-565
- Schmitt CA, Fridman JS, Yang M et al. Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell* 2002; 1: 289-298
- Schnaiter A, Rossi M, Paschka P et al. NOTCH1, SF3B1 and TP53 Mutations in Fludarabine-Refractory CLL Patients Treated with Alemtuzumab: Results From the CLL2H Trial of the GCLLSG Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2012; 120: 710
- Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNAdependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 228-36
- Schultz RA, Cawich V, Valentin C et al. Detection of balanced translocations in hematologic disorders by array CGH *Cancer Genetics* 2011; 4: 25
- Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S et al. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 1039–1044
- Sellmann L, Gesk S, Walter C et al. Trisomy 19 is associated with trisomy 12 and mutated IGHV genes in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2007; 138: 217–220

Sellmann L, de Beer D, Bartels M et al. Telomeres and prognosis in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Int J Hematol*. 2011; 93: 74-82

Seymour JF, Talpaz M, Cabanillas F et al. Serum interleukin-6 levels correlate with prognosis in diffuse large-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1995; 13: 575-582

Sfeir A, Kosiyatrakul ST, Hockemeyer D et al. Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 2009; 138:90-103

Shanafelt T, Zent C, Byrd J et al. Phase II trials of single-agent anti-VEGF therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2010; 51: 2222-9

Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* 1991; 196: 33-39

Shiotani B, and Zou L. ATR signaling at a glance. *J. Cell Sci* 2009; 122: 301–304

Skowronska A, Austen B, Powell JE et al. ATM germline heterozygosity does not play a role in chronic lymphocytic leukemia initiation but influences rapid disease progression through loss of the remaining ATM allele. *Haematologica*. 2012 (b); 97:142-6

Skowronska A, Parker A, Ahmed G et al. Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *J Clin Oncol* 2012 (a); 30: 4524-32

Smith S, Giriati I, Schmitt A, de Lange T. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 1998; 282: 1484-7

Smogorzewska A, Van Steensel B, Bianchi A et al. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 2000; 20:1659–68

Smolej L, Andrys C, Pekova S et al. Plasma levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and their association with IgVH mutation status in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006; 91: 1432-3

Smonskey MT, Block AW, Deeb G et al. Monoallelic and biallelic deletions of 13q14.3 in chronic lymphocytic leukemia: FISH vs miRNA RT-qPCR detection. *Am J Clin Pathol* 2012; 137: 641-6

Sorrer ML, Storer BE, Sandmaier BM et al. Five-year follow-up of patients with advanced chronic lymphocytic leukemia treated with allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 4912-4920

Stamatoullas A, Waultier A, Jardin F et al. Development of a multiplex PCR assay for the detection of genomic copy number changes in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2012; 36: 93-7

Stamatopoulos K, Belessi C, Hadzidimitriou A et al. Immunoglobulin light chain repertoire in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005; 106: 3575-3583

Stankovic T, Weber P, Stewart G et al. Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1999; 353: 26–9

Stansel RM, de Lange T, Griffith JD. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO Journal* 2001; 20: 5532-5540

Stevens-Kroef M, Simons A, Gorissen H et al. Identification of chromosomal abnormalities relevant to prognosis in chronic lymphocytic leukemia using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; 195: 97–104

Stevenson FK and Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004; 103: 4389-4395

Stewart SA, Ben-Porath I, Carey VJ et al. Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nat Genet* 2003; 33: 492-496

Stilgenbauer S, Liebisch P, James MR et al. Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.2-q23.1 in lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11837

Stilgenbauer S, Sandrine Sander, Lars Bullinger et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival *Haematologica* 2007; 92: 1242-5

Struski S, Gervais C, Helias C et al. Stimulation of B-cell lymphoproliferations with CpG-oligonucleotide DSP30 plus IL-2 is more effective than with TPA to detect clonal abnormalities. *Leukemia* 2009; 23: 617–619

Sturm I, Bosanquet AG, Hermann S et al. Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA-damaging chemotherapy. *Cell Death Differ* 2003; 10: 477-484

T

Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood* 2009; 114: 957-964

Taylor WR and Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001; 20: 1803-15

Tchirkov A, Rolhion C, Bertrand S et al. IL-6 gene amplification and expression in human glioblastomas. *British Journal of Cancer* 2001; 85: 518-522

Tchirkov A, Chaleteix C, Magnac C et al. hTERT expression and prognosis in B- chronic lymphocytic leukaemia. *Annals of Oncology* 2004; 15: 1476-1480

Terrin L, Trentin L, Degan M et al. Telomerase expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia predicts survival and delineates subgroups of patients with the same igVH mutation status and different outcome. *Leukemia* 2007; 21: 965-72

Theobald DL, Wuttke DS. Prediction of multiple tandem OB-fold domains in telomere endbinding proteins Pot1 and Cdc13. *Structure* 2004; 12: 1877–79

Tobin G., Thunberg U., Johnson A. et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood* 2003; 101, 4952-4957

Tobin G, Thunberg U, Johnson A et al. Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99: 2262-2264

Tosato G, Jones K, Breinig MK et al. Interleukin-6 production in posttransplant lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 1993; 91: 2806-2814

Trbusek M, Malcikova J, Smardova J et al. Inactivation of p53 and deletion of ATM in B-CLL patients in relation to IgVH mutation status and previous treatment. *Leukemia* 2006; 20: 1159-1161

Trbusek M, Smardova J, Malcikova J et al. Missense mutations located in structural p53 DNA-binding motifs are associated with extremely poor survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 2703-8

Trentin L, Ballon G, Ometto L et al. Telomerase activity in chronic lymphoproliferative disorders of B-cell lineage. *Br J Haematol* 1999; 106: 662-8

U

Ulaner GA, Hu JF, Vu TH et al. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res* 1998; 58: 4168-72

V

Van Overbeek M, de Lange T. Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase. *Curr Biol* 2006; 16: 1295-302

Veldman T., Etheridge K.T. and Counter C.M. Loss of hPot1 function leads to telomere instability and a cut-like phenotype. *Curr Biol* 2004; 14: 2264–2270

Venkatachalam S, Shi YP, Jones SN et al. Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO J*. 1998; 17: 4657-67

Verstovsek S, Giles FJ, O'Brien S et al. Telomerase activity is not a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2004; 28: 707-11

Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 2013; 27: 1100-6

Vogler M, Butterworth M, Majid A, Walewska RJ, Sun XM, Dyer MJ, Cohen GM. Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009 Apr 30;113(18):4403-13

Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 594-604

W

Wan Y, Lawrence M, Wang L et al. Large-Scale CLL Genome Analysis Reveals Novel Cancer Genes, Including SF3B1 Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2011; 118: 463

Wang F, Podell ER, Zaug AJ et al. The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* 2007; 445: 506–10

Wang JM, Chao JR, Chen W et al. The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6195-6206

Wang, S. and J. Zhu. Evidence for a relief of repression mechanism for activation of the human telomerase reverse transcriptase promoter. *J Biol Chem* 2003; 278(21): 18842-50

Wang Y, Ghosh G, Hendrickson EA. Ku86 represses lethal telomere deletion events in human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106:12430-5

Wang X W, Yeh H, Schaeffer L, Roy R et al.. p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat. Genet* 1995; 10: 188-195

Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B et al. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*. 1994; 84: 3148-3157

Weng NP, Hathcock KS, Hodes RJ. Regulation of telomere length and telomerase in T and B cells: a mechanism for maintaining replicative potential. *Immunity* 1998; 9: 151-7

Wertz IE, Kusam S, Lam C et al. Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature*. 2011; 471: 110-4

Wierda WG, O'Brien S, Wang X et al. Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2011; 29(31): 4088-95

Wiernik PH, Ashwin M, Hu XP et al. Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 113: 407-414

Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukaemia subtype with unmutated immunoglobuline genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003; 101: 4944-4951

Woodroffe C, Muller W, Ruther U. Long-term consequences of interleukin-6 overexpression in transgenic mice. *DNA Cell Biol* 1992; 11: 587-592

X

Xin H, Liu D, Wan M et al. TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature* 2007; 445: 559–62

Xu D, Wang Q, Gruber A et al. Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* 2000; 19: 5123-5133

Xu Q, Briggs J, Park S et al. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene* 2005; 24: 5552-60

Xu-Monette ZY, Medeiros LJ, Li Y et al. Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood*. 2012; 119: 3668-83

Y

Yang Q, Zheng YL, Harris CC. POT1 and TRF2 cooperate to maintain telomeric integrity. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1070–80

Ye JZ, Donigian JR, Van Overbeek M et al. TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J Biol Chem* 2004; 279: 47264–71

Yee C, Biondi A, Wang XH, Iscove NN, de Sousa J, Aarden LA, Wong GG, Clark SC, Messner HA, Minden MD. A possible autocrine role for interleukin-6 in two lymphoma cell lines. *Blood* 1989; 74: 798-804

Ysebaert L, Struski S, Prade N et al. Relative Impact of NOTCH1/SF3B1 Mutations, Complex Karyotype and TP53 Disruption in the Prognosis of Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2012; 120: 2879

Yu J, Zhang L, Hwang PM et al. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 2001; 7: 673-682

Yuille MR, Matutes E, Marossy A et al. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br J Haematol* 2000; 109: 794-799

Z

Zauberman A, Zipori D, Krupsky M, Ben-Levy R. Stress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3. *Oncogene* 1999; 18: 3886-3893

Zenz T, Eichhorst B, Busch R et al: TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010 (b); 28: 4473-4479

Zenz T, Häbe S, Denzel T et al. The activity of alemtuzumab is independent of p53 mutational status in fludarabine refractory CLL: interim analysis from the CLL2H trial. *Leuk Lymphoma* 2007; 48: S177

Zenz T, Häbe S, Denzel T et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* 2009; 114: 2589-97

Zenz T, Kröber A, Scherer K et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 2008; 112: 3322-9

Zenz T, Vollmer D, Trbusek M et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 2010 (a); 24: 2072-2079

Zhou P, Qian L, Bieszczad CK et al. Mcl-1 in transgenic mice promotes survival in a spectrum of hematopoietic cell types and immortalization in the myeloid lineage. *Blood* 1998; 92: 3226-39

Zhou P, Qian L, Kozopas KM, Craig RW. Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood* 1997; 15;89: 630-43

Zhou XZ, Lu KP. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* 2001; 107: 347-59

Zhu XD, Kuster B, Mann M et al. Cell cycle-regulated association of RAD50/MRE11/ NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* 2000; 25: 347-52

Zhu XD, Niedernhofer L, Kuster B et al. ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. *Mol Cell* 2003; 12: 1489-98

Zimmermann S, Martens UM. Review: Telomeres, senescence and hematopoietic stem cells. *Cell Tissue Res* 2008; 331: 79-90

Zupo S, Cutrona G, Mangiola M, Ferrarini M. Role of surface IgM and IgD on survival of the cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99: 2277-8

VI- ANNEXES

1. ARTICLE PUBLIE DANS LE CADRE DE LA THESE

ARTICLE 1 : revue de la littérature

VERONESE L , TCHIRKOV A, GOUAS L, PERISSEL B, GOUMY C, VAGO P. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: focus on recent biomarkers. <i>Ann Biol Clin</i> 2008; 66(4): 371-7

Les formes précoces de LLC – qui sont les plus fréquentes au diagnostic à l’heure actuelle - présentent un pronostic individuel extrêmement variable, certains patients restant stables durant des années, alors que d’autres évoluent plus ou moins rapidement vers des formes agressives de la maladie. L’évaluation du pronostic individuel des formes précoces de LLC est donc un défi pour les cliniciens ; bien que les stades clinico-biologiques restent le fondement de l’évaluation, de nombreux marqueurs biologiques apportent des informations indépendantes sur le pronostic des patients. Il est d’usage de distinguer les facteurs classiques du pronostic, décrits au cours des années 1980, et les facteurs récents, décrits à partir de la fin des années 1990, dont certains sont largement validés, tandis que pour d’autres des investigations supplémentaires restent nécessaires pour en confirmer l’impact pronostique.

Nous proposons de détailler dans cette revue ces nouveaux facteurs du pronostic des LLC, notamment les différents marqueurs sériques, les anomalies cytogénétiques des lymphocytes pathologiques, le statut mutationnel des gènes des immunoglobulines (IgV_H), l’expression de CD38 et l’expression de ZAP-70.

Pronostic de la leucémie lymphoïde chronique : mise au point sur les facteurs biologiques récents

Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: focus on recent biomarkers

L. Véronèse^{1,2}

A. Tchirkov^{1,2}

L. Gouas^{1,2}

B. Périsset^{1,2}

C. Goumy^{1,2}

P. Vago^{1,2}

¹ Faculté de médecine,
Cytologie histologie embryologie
cytogénétique,
Université Clermont 1, Clermont-Ferrand

² Service de cytogénétique médicale,
CHU Clermont-Ferrand
<lveronese@chu-clermontferrand.fr>

Résumé. Les formes précoces de leucémie lymphoïde chronique (LLC), qui sont les plus fréquentes au diagnostic à l'heure actuelle, présentent un pronostic individuel extrêmement variable, certains patients restant stables durant des années, alors que d'autres évoluent plus ou moins rapidement vers des formes agressives de la maladie. L'évaluation du pronostic individuel des formes précoces de LLC est donc un défi pour les cliniciens ; bien que les stades clinico-hématologiques restent le fondement de l'évaluation, de nombreux marqueurs biologiques apportent des informations indépendantes sur le pronostic des patients. Il est d'usage de distinguer les facteurs classiques du pronostic, décrits au cours des années 1980, et les facteurs récents, décrits à partir de la fin des années 1990, dont certains sont largement validés, tandis que pour d'autres des investigations supplémentaires restent nécessaires pour en confirmer l'impact pronostique. Nous proposons de détailler dans cette revue ces nouveaux facteurs du pronostic des LLC, notamment les différents marqueurs sériques, les anomalies cytogénétiques des lymphocytes pathologiques, le statut mutationnel des gènes des immunoglobulines (IgVH), l'expression de CD38 et l'expression de ZAP-70.

Mots clés : leucémie lymphoïde chronique, pronostic, cytogénétique, statut mutationnel des gènes des immunoglobulines

Abstract. Early stages of chronic lymphocytic leukemia (CLL), which are the most frequent at diagnosis, have an extremely variable individual prognosis, as some patients remain stable for years whereas others develop aggressive forms of the disease less or more rapidly. Individual prognosis evaluation of early stages of CLL is then a challenge for physicians; also clinico-hematological stages are still the evaluation basis, numerous biological markers are helpful in providing independent information on patient prognosis. It is useful to distinguish the classical prognosis factors, described in the 1980s, and the recent markers described from the end of the 1990s, which are widely validated for certain, whereas for others further investigations are needed to confirm their prognostic impact. We propose to detail in this review these new prognostic factors of CLL, especially the different serum markers, cytogenetical abnormalities of pathologic lymphocytes, mutational status of the immunoglobulin genes (IgVH) and CD38 and ZAP-70 expression.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, prognosis, cytogenetic, mutational status of the immunoglobulin genes

Article reçu le 15 février 2008,
accepté le 19 mai 2008

Tirés à part : L. Véronèse

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est un syndrome lymphoprolifératif chronique caractérisé par une accumulation dans la moelle et le sang périphérique de petits lymphocytes B d'aspect mature et d'origine monoclonale, qui présentent un phénotype particulier associant entre autres l'expression de CD5, CD19 et CD23. Cette hémopathie est la plus fréquente des leucémies dans les pays occidentaux et affecte principalement le sujet âgé, avec un tiers seulement des patients ayant moins de 60 ans au moment du diagnostic. En raison du caractère volontiers asymptomatique de la maladie, le diagnostic est souvent posé de façon fortuite, à l'occasion d'un hémogramme systématique. La survie médiane globale des patients atteints de LLC est de l'ordre de 10 ans, mais l'évolution clinique est individuellement extrêmement variable avec une survie allant de quelques mois à des dizaines d'années. En effet, certains patients présentent une forme indolente ne modifiant pas l'espérance de vie, alors que, pour d'autres, la maladie a un comportement agressif et progresse rapidement avec une survie après diagnostic inférieure à 2-3 ans.

Dans ce contexte d'évolution individuelle variable, et en l'absence de traitement curateur, la prise en charge des patients atteints de LLC ne peut s'envisager qu'après évaluation du pronostic de la pathologie. Un certain nombre de marqueurs cliniques et biologiques du pronostic ont été décrits dans les années 1980, mais depuis la fin des années 1990 l'évaluation du pronostic de la LLC a connu un formidable essor : après un bref rappel des marqueurs

classiques du pronostic, nous détaillerons dans cette revue les nouveaux outils du pronostic dans la LLC, en insistant sur ceux reconnus avant de conclure par ceux à réévaluer.

Facteurs classiques du pronostic

Les classifications clinico-biologiques de Rai (utilisée essentiellement aux Etats-Unis) et de Binet (utilisée préférentiellement en Europe) demeurent indispensables pour l'évaluation du pronostic des patients atteints de LLC [1, 2] (*tableau 1*). L'évaluation du stade de chaque patient ne nécessite qu'un examen clinique associé à la réalisation d'un hémogramme : cette simplicité constitue l'une des forces de ces systèmes de classifications. En outre, ces stades cliniques ont été par la suite validés et corroborés par de nombreux travaux de recherche clinique. Ils ont également permis de grandes avancées dans la compréhension de la biologie de la LLC en permettant la comparaison de groupes homogènes de patients.

Néanmoins, il existe quelques limites à la valeur pronostique de ces stades cliniques. En effet, si l'évolution des patients dits à risque intermédiaire et à haut risque est maintenant bien connue, la grande majorité des patients (80 %) présente une maladie à faible risque au moment du diagnostic, celui-ci étant de plus en plus souvent posé à l'occasion d'un hémogramme réalisé à titre systématique. Pour ces patients, malheureusement, le stade clinique (stades 0 selon Rai, stades A selon Binet) ne préjuge pas de

Tableau 1. Classifications de Rai (1) et de Binet (2).

1. Pronostic	Stade	Critères de définition	Pourcentage des LLC	Survie médiane (années)
Bon	0	Lymphocytose > 4 G/L	31 %	> 10
Intermédiaire	I	Lymphocytose + adénopathies	35 %	9
	II	Lymphocytose + hépato- ou splénomégalie Les adénopathies peuvent ne pas être présentes	26 %	5
Mauvais	III	Lymphocytose + Hb < 110 g/L Les organomégalies peuvent être ou ne pas être présentes	6 %	2
	IV	Lymphocytose + plaquettes < 100 G/L Les organomégalies et l'anémie peuvent être ou ne pas être présentes	2 %	2
2. Pronostic	Stade	Critères de définition	Pourcentage des LLC	Survie médiane (années)
Bon pronostic	A	Lymphocytose > 4 G/L Hb > 100 g/L Plaquettes > 100 G/L Moins de 3 aires lymphoïdes atteintes ⁽¹⁾	63 %	> 10
Pronostic intermédiaire	B	Lymphocytose > 4 G/L Hb > 100 g/L Plaquettes > 100 G/L Atteintes d'au moins trois aires lymphoïdes	30 %	5
Mauvais pronostic	C	Lymphocytose > 4 G/L Hémoglobine < 100 g/L et/ou plaquettes < 100 G/L, quel que soit le nombre d'aires lymphoïdes atteintes	7 %	2

⁽¹⁾ Les aires lymphoïdes considérées sont cervicales, axillaires, inguinales (uni- ou bilatérales), la rate et le foie.

Tableau 2. Facteurs pronostiques biologiques classiques.

	Pronostic favorable	Pronostic péjoratif
Temps de doublement de la lymphocytose	> 12 mois	< 12 mois
Aspect cytologique des lymphocytes sanguins	≤ 10% polylmphocytes	> 10% polylmphocytes
Infiltration de la moelle osseuse	Non diffuse	Diffuse
Sous-groupe des stades A	A'	A''

Les stades A' se définissent par un stade A avec lymphocytose ≤ 30 G/L et Hb ≥ 120 g/L ; les stades A'' se définissent par un stade A avec lymphocytose > 30 G/L et/ou Hb < 120 g/L.

l'évolution et ne permet pas d'identifier les patients porteurs d'une forme indolente des patients atteints d'une forme agressive de la maladie. Un certain nombre de marqueurs biologiques du pronostic décrits dans les années 1980 sont alors venus renforcer les classifications clinico-biologiques, comme l'étude du temps de doublement de la lymphocytose [3], de l'infiltration de la biopsie médullaire [4], de la morphologie des lymphocytes sanguins [5] et des sous-groupes des stades A [6] (tableau 2).

Nouveaux facteurs du pronostic

Plus récemment, de nombreux nouveaux facteurs du pronostic ont été décrits (tableau 3) : certains ont été largement étudiés et leur impact positif ou péjoratif sur le pronostic est bien connu ; d'autres sont moins bien évalués et la confirmation de leur valeur pronostique par des investigations complémentaires reste nécessaire.

Marqueurs sériques

Différents paramètres sérologiques, comme la concentration de $\beta 2$ -microglobuline ($\beta 2M$), de thymidine-kinase

(TK) et de CD23 soluble (sCD23) ont émergé comme étant des facteurs de pronostic indépendants corrélés à la progression de la maladie et la survie [7-9].

La $\beta 2M$ est une protéine extracellulaire qui est liée de façon non-covalente à la chaîne α du Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I : elle est détectable dans le sérum. Une concentration élevée de $\beta 2M$ au diagnostic est associée à un pronostic péjoratif et à une survie raccourcie [7] ; cette valeur pronostique forte est indépendante d'autres éléments du pronostic [8].

La concentration de thymidine-kinase sérique est corrélée à la masse tumorale et à l'activité proliférative de la LLC ; elle permet de prédire la progression de la maladie chez les patients atteints de forme précoce de LLC [8].

Le CD23 est un marqueur de surface des cellules de LLC-B. Une concentration sérique élevée de sa forme clivée (sCD23) indique un pronostic péjoratif ; cette élévation de sCD23 sérique est associée à des caractéristiques défavorables comme une infiltration diffuse de la moelle osseuse, un temps de doublement court et une progression de la maladie dans les formes précoces de LLC [9].

Il est important de préciser que l'utilisation de la valeur pronostique de ces marqueurs sériques est limitée par l'absence de technique standardisée entre laboratoires et par l'usage de différentes valeurs seuils.

Cytogénétique

Dans la LLC, les études cytogénétiques ont pendant longtemps été limitées par le faible index mitotique des lymphocytes néoplasiques, menant à un échec de culture cellulaire dans 40 % des cas, ou par la qualité sous-optimale des métaphases obtenues dans les cas restants, des anomalies clonales n'étant mises en évidence au final que pour 40 à 50 % des patients.

L'usage de la fluorescence *in situ* par hybridation (FISH) sur noyaux interphasiques a initialement permis de remédier à cet écueil et a grandement amélioré la sensibilité de l'analyse cytogénétique. La FISH présente deux avantages par rapport à la cytogénétique conventionnelle : elle permet la mise en évidence d'anomalies chromosomiques spécifiques sur des cellules qui ne sont pas en cycle (ce qui est le cas pour une grande majorité des lymphocytes tumo-

Tableau 3. Facteurs pronostiques nouveaux

Facteurs largement étudiés
Marqueurs sériques : thymidine-kinase, sCD23 et $\beta 2$ -microglobuline
Cytogénétique conventionnelle et moléculaire
Statut mutationnel des immunoglobulines
Expression de CD38
Expression de ZAP-70
Facteurs à valider
Marqueurs sériques : VEGF, thrombopoïétine
Longueur des télomères
Expression de la télomérase (hTERT)
mRNA de AID (Activation-induced cytidine deaminase)
Expression de la lipoprotéine lipase A
Expression de ADAM29
Profil d'expression des microRNA
Liés au traitement
Réponse au traitement : obtention d'une maladie résiduelle minimale négative

raux de LLC-B) et elle est capable de détecter une perte de matériel chromosomique de l'ordre de 100 kilobases (kb), ce qui est bien en dessous du seuil de résolution du caryotype standard (entre 5 et 10 Mb). Cette technique moléculaire de cytogénétique a permis de mettre en évidence des anomalies clonales récurrentes dans 80 % des cas de LLC, notamment les délétions 13q14, 11q, 17p et la trisomie 12 ; la valeur pronostique particulière de ces anomalies chromosomiques a par la suite été démontrée [10].

La délétion 13q14 est la plus fréquente des anomalies retrouvées (55 %) ; elle est associée à un bon pronostic si elle est isolée, avec une médiane de survie de 133 mois contre 111 mois si le caryotype est normal. La trisomie 12 (16 % des cas) est associée à une morphologie et un immunophénotypage atypiques des lymphocytes pathologiques, à un fort taux de prolifération et à un stade clinique avancé : son impact pathogénique reste à préciser et l'évolution de la maladie est intermédiaire (médiane de survie de 114 mois). La délétion 11q22 (18 %) entraîne la perte du gène *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*) impliqué dans les phénomènes de réparation de l'ADN ; elle est associée à la présence de lymphadénopathies et à une survie raccourcie (médiane de survie de 79 mois). La délétion 17p13 (7 %) emporte le gène suppresseur de tumeur *p53* et a une valeur très péjorative sur le pronostic du patient (médiane de survie de 32 mois). Sur un plan clinique et thérapeutique, la recherche de ces délétions 11q22 et 17p13 est particulièrement utile car ces anomalies sont associées à une moindre réponse voire à une résistance aux cytotoxiques classiquement utilisés dans cette hémopathie, notamment la fludarabine, et peuvent poser l'indication du recours à une immunothérapie par anticorps monoclonaux [11]. Une délétion 6q, un réarrangement du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines en 14q32 ou une trisomie partielle 3q ou 8q peuvent également être retrouvés chez 5 % des patients [10]. Il a enfin été démontré qu'en présence de translocations équilibrées ou déséquilibrées ou en cas de caryotype complexe (présence d'au moins trois anomalies indépendantes), la survie sans traitement est raccourcie [12].

Récemment, il a été montré que l'utilisation de nouvelles techniques de cultures cellulaires avec immunostimulation par oligonucléotides CpG et interleukine-2 (IL-2) permet d'améliorer le rendement des techniques chromosomiques de la cytogénétique [13]. En effet, l'obtention de métaphases a été possible dans 95 % des 506 cas analysés et des aberrations chromosomiques ont été détectées par techniques de bandes dans plus de 80 % de ces échantillons et par FISH dans 78 % des cas. Par ailleurs, le caryotype permet la mise en évidence d'anomalies non visualisées en FISH, notamment les translocations ou les caryotypes complexes, ce qui démontre la complémentarité de ces deux approches cytogénétiques.

Au total, l'étude cytogénétique des lymphocytes tumoraux est une donnée centrale dans l'évaluation du pronostic individuel des patients ; elle doit donc être réalisée en routine. Enfin, il est important de noter que la valeur pronostique de ces anomalies cytogénétiques est indépendante de celle du stade clinique et du statut mutationnel des gènes des immunoglobulines [10].

Statut mutationnel des gènes des régions variables des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgVH)

En 1999, deux groupes de chercheurs mirent en évidence qu'environ 50 % des patients présentaient dans les cellules leucémiques des hypermutations somatiques dans les régions variables réarrangées des chaînes lourdes des immunoglobulines [14, 15]. L'étude de ce statut mutationnel permet de répartir les patients en deux groupes d'évolution bien distincte, l'absence de mutation des IgVH se définissant par une homologie ≥ 98 % à la séquence germinale. Ainsi, les LLC dites « naïves » ou non mutées, c'est-à-dire développées à partir d'un lymphocyte B naif n'ayant pas transité par le centre germinatif du follicule lymphoïde secondaire et n'ayant pas rencontré d'antigène, sont différenciées des LLC dites « mémoires » ou mutées, c'est-à-dire développées à partir d'un lymphocyte B mémoire qui a transité par le centre germinatif et subi le phénomène d'hypermutation somatique des IgVH. Les patients mutés ont une évolution favorable et une faible probabilité de développer une maladie agressive, alors que les patients non mutés sont à risque de présenter une pathologie évolutive avec une survie raccourcie. L'absence de mutation est également associée à une morphologie atypique des lymphocytes du sang périphérique, à une plus grande fréquence d'anomalies cytogénétiques défavorables (sans lien statistique significatif) et à une résistance à la chimiothérapie.

Cependant, le séquençage des gènes IgVH n'est pas une technique de routine et le statut mutationnel ne peut donc pas être déterminé pour tous les patients au diagnostic : cet élément majeur du pronostic reste à l'heure actuelle réservé à la recherche clinique. Par conséquent, de nouveaux facteurs du pronostic relevant de techniques aisées à mettre en œuvre ont été recherchés comme substituts au statut mutationnel des IgVH.

Expression de CD38

L'expression de CD38 sur les lymphocytes tumoraux fut le premier marqueur à être corrélé au statut mutationnel des IgVH [14]. Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire qui témoigne de l'activation et de la maturation cellulaire et qui joue un rôle dans la signalisation. Une forte expression de CD38 (20 % ou plus des lymphocytes de LLC) mesurée par cytométrie en flux est associée à une morphologie atypique des cellules néoplasiques, à une infiltration

diffuse de la moelle osseuse, à une concentration de lymphocytes dans le sang périphérique élevé et à un pronostic global défavorable [16].

Cependant, depuis les travaux de Damle *et al.* (1999), il a été constaté que l'expression de CD38 et le statut mutationnel ne sont pas toujours corrélés et que l'expression de CD38 peut varier dans le temps. L'expression de CD38 est maintenant considérée comme un facteur de pronostic indépendant.

D'autre part, le seuil de positivité de CD38 est sujet à controverse, les différentes valeurs seuils proposées étant 5 %, 7 %, 20 % et 30 % [15-17]. Un récent travail de Gentile *et al.* (2005) a évalué l'expression de CD38 chez 242 patients au diagnostic et sur du matériel frais afin de rechercher le seuil de positivité le plus pertinent : il semble qu'une expression de CD38 supérieure ou égale à 7 % soit un paramètre important pour l'identification des LLC précoces à risque évolutif défavorable et que cette expression soit stable dans le temps [17]. En pratique, une standardisation des techniques de cytométrie en flux semble néanmoins encore nécessaire pour la quantification de l'expression de CD38.

Expression de ZAP-70

Une étude du profil d'expression de gènes dans la LLC a permis d'identifier un panel de gènes, notamment ZAP-70, dont l'expression était corrélée au statut mutationnel des IgVH.

ZAP-70 (*zeta-associated-protein-70*), une tyrosine-kinase normalement exprimée dans les lymphocytes T, est essentielle pour l'activation des lymphocytes T par l'antigène. Cette protéine n'est pas exprimée dans les cellules B circulantes à l'état physiologique ; son expression par des lymphocytes tumoraux de type B est donc inattendue. Le travail de Crespo *et al.* (2003) montre que l'expression de ZAP-70 (définie par plus de 20 % des cellules tumorales positives) déterminée par cytométrie en flux chez 56 patients est corrélée à l'absence de mutation des IgVH, à une progression plus rapide de la maladie et à une survie raccourcie des patients [18].

Une étude américaine réalisée sur une plus grande série de patients (n = 307) confirme la forte association entre l'expression de ZAP-70 et l'absence de mutation des gènes des IgVH et montre que ZAP-70 est un puissant indicateur de la nécessité d'un traitement [19]. Néanmoins, 23 % des patients présentent une discordance entre l'expression de ZAP-70 et le statut mutationnel, avec des patients non mutés n'exprimant pas ZAP-70 et des patients mutés exprimant ZAP-70. Ce pourcentage de discordance plus élevé que dans les études européennes peut s'expliquer par un effectif plus important et l'usage d'anticorps différents [18, 20]. En pratique, il semble plus informatif pour le pronostic individuel du patient de disposer

du statut mutationnel et de l'expression de ZAP-70 plutôt que d'un seul de ces deux facteurs.

Autres facteurs de pronostic

Divers autres facteurs du pronostic corrélés au statut mutationnel ont été proposés. Avant leur utilisation en clinique, ils nécessitent d'être validés par des travaux complémentaires sur de plus larges séries de patients et dans le cadre d'études prospectives.

Ainsi, l'expression de la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT), déterminée par RT-PCR quantitative, permettrait de discriminer les LLC mutées des LLC non mutées dans 89 % des cas, aussi bien parmi les patients tous stades confondus que parmi les stades A (résultats obtenus sur une série de 115 patients) [21]. La longueur des télomères, évaluée par PCR quantitative en temps réel (Tel-PCR), est également un facteur de pronostic qui, utilisé en combinaison avec le statut mutationnel des IgVH, permettrait d'identifier deux groupes de patients auparavant méconnus parmi les patients mutés, l'un avec des télomères plus longs et une survie plus favorable et l'autre avec des télomères raccourcis et une évolution défavorable [22].

Une expression élevée de l'ARN messager du gène *AID* (*activation-induced cytidine deaminase*) est associée à l'absence de mutation des gènes des IgVH et à des anomalies cytogénétiques péjoratives [23]. Des observations similaires ont été rapportées pour les gènes codant la lipoprotéine lipase A (LPL) et ADAM29 (*A disintegrin and metalloproteinase 29*), qui ne sont pas exprimés par les lymphocytes normaux et peuvent à ce titre être évalués par RT-PCR quantitative [24].

Une relation directe entre le niveau plasmatique de la thrombopoïétine (TPO) et des gènes IgVH non mutés a également été récemment rapportée [25].

D'après Molica *et al.* (1999), un niveau sérique élevé de VEGF (*vascular endothelial growth factor*), déterminé par Elisa, serait prédictif du risque de progression des formes précoces de LLC ; par ailleurs il existe une corrélation positive entre le niveau de VEGF circulant et l'expression de ZAP-70, l'expression de CD38 et le statut mutationnel des IgVH [26]. Néanmoins, nos travaux ont permis récemment de montrer que l'expression du gène *VEGF* est indépendante des marqueurs classiques du pronostic, notamment le stade selon Binet et le statut mutationnel ; par contre, une expression plus importante de *VEGF* est associée à une survie plus courte chez les patients tous stades confondus [27].

Par ailleurs, une étude du profil d'expression de microRNA (petits ARN non codants de 19 à 24 nucléotides qui régulent l'expression de protéines cibles en empê-

chant la traduction et/ou en provoquant la dégradation de leur ARN messager) a montré une signature unique composée de 13 gènes sur 190 analysés. Cette signature est associée à la présence ou à l'absence de progression de la LLC et permet de différencier les patients exprimant ou n'exprimant pas ZAP-70, ainsi que les patients mutés ou non mutés [28].

Enfin, nous avons mis en évidence récemment que l'expression du gène anti-apoptotique myéloïde-cell-leukemia-1 (*MCL-1*), évaluée par RT-PCR quantitative en temps réel, est un indicateur du pronostic pour les patients tous stades confondus ainsi qu'en stade A, les patients exprimant faiblement *MCL-1* constituant un groupe de patients dont la survie globale est prolongée [29]. L'expression de *MCL-1* est également prédictive de la survie sans traitement des patients en stade A. Ce nouveau marqueur est indépendant des marqueurs classiques du pronostic, en particulier du statut mutationnel des IgVH.

Réponse au traitement

La réponse au traitement est un paramètre du pronostic important en soi, la survie étant d'autant plus longue que cette réponse est forte : l'objectif est donc d'obtenir une maladie résiduelle minimale. Cette maladie résiduelle minimale peut être évaluée par PCR spécifique d'allèle des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines ou par cytométrie en flux à quatre couleurs avec trois différentes combinaisons d'anticorps équivalentes (CD5/CD19 avec CD20/CD38, CD81/CD22 ou CD79b/CD43). Bien que la PCR ait une sensibilité légèrement supérieure, les deux méthodes sont considérées comme équivalentes du point de vue clinique. A ce jour, la cytométrie en flux est plus facilement applicable en pratique quotidienne [30].

Ces éléments prédictifs de la réponse au traitement prennent de plus en plus d'importance en raison du nombre croissant de nouveaux traitements de la LLC et de leur efficacité fréquemment variable d'un patient à l'autre. Définir des sous-groupes de patients répondant ou non à un traitement permet d'éviter une toxicité inutile de la thérapeutique et limite, du moins en théorie, l'émergence de clones résistants. Ainsi, les anomalies en 17p reflétant une altération de *p53* confèrent une résistance à la fludarabine ; la délétion 11q qui emporte le gène *ATM* est associée à un taux de réponse plus faible à la fludarabine et à des rechutes précoces après autogreffe de cellules souches périphériques [11]. La capacité du niveau d'expression de ZAP-70 et CD38 et de l'absence de mutation des IgVH à prédire la réponse au traitement n'a pas encore été parfaitement évaluée sur de larges séries homogènes de patients, mais il semble néanmoins que le taux de réponse globale soit plus faible chez les patients exprimant ces marqueurs,

avec surtout une durée raccourcie de cette réponse au traitement. Enfin, des concentrations sériques élevées de $\beta 2M$ semblent corrélées à une réponse plus faible à la chimio-immunothérapie par fludarabine, cyclophosphamide et rituximab.

Conclusion

Les facteurs biologiques du pronostic de la LLC sont en nombre croissant, mais tous ne peuvent pas être étudiés et pris en compte en routine lors du diagnostic, leur valeur pronostique n'étant pas encore bien établie ou leur mise en œuvre étant encore à ce jour trop complexe.

En pratique, une étude cytogénétique exhaustive des lymphocytes sanguins doit impérativement être réalisée au diagnostic ou lors d'une reprise évolutive pour la stratification du pronostic et la prise en charge thérapeutique : elle comprend l'étude du caryotype standard et la recherche d'anomalies récurrentes par FISH, notamment les délétions 17p et 11q. Le dosage de $\beta 2M$ est un test simple, fiable et utilisable en routine. L'évaluation de l'expression de CD38 est également aisée à mettre en œuvre au diagnostic, lors de l'immunophénotypage initial des lymphocytes tumoraux ; l'étude de l'expression de ZAP-70 peut être effectuée dans le même temps, mais à l'heure actuelle ce test ne relève pas encore de la pratique quotidienne de tous les centres. L'étude du statut mutationnel des IgVH est une technique longue et coûteuse qui n'est pas adaptée à la routine et qui, à ce titre, est uniquement effectuée dans le cadre de protocoles de recherche clinique, tout comme le dosage sérique de la thymidine kinase. De la même façon, l'étude de l'expression de gènes par RT-PCR quantitative, comme *hTERT*, *MCL-1*, *VEGF*, *LPL* ou *ADAM29*, est pour l'instant effectuée dans le cadre de travaux de recherche clinique. Enfin, l'évaluation de la maladie résiduelle par cytométrie en flux est une donnée indispensable du pronostic du patient, notamment afin d'adapter l'attitude thérapeutique.

La survie médiane des patients atteints de LLC a augmenté de 5-6 ans entre les séries rapportées il y a 20 ans et les séries récentes. Malgré cette évolution favorable, porter un diagnostic de LLC peut avoir un impact significatif sur la survie des patients, surtout des plus jeunes. A ce titre, la mise en évidence de nouveaux facteurs du pronostic, fiables et simples à évaluer, pourra faciliter la conception et la réalisation d'essais cliniques randomisés afin d'évaluer l'efficacité, la toxicité et le bénéfice de traitements intensifs chez des sujets porteurs de formes précoces de LLC à haut risque d'évolution défavorable. De cette façon, la mise en place de tels traitements sera adaptée au risque propre du patient, non seulement en fonction du stade clinico-biologique, mais aussi selon les caracté-

ristiques propres du patient (comme son âge, son état général et ses comorbidités) et les caractéristiques biologiques des cellules malignes : l'attitude jusque-là admise et validée selon laquelle les patients atteints de LLC en phase précoce ne doivent pas être traités pourrait ainsi être remise en cause dans les années à venir, ce qui constituerait un nouveau défi dans la prise en charge de cette hémopathie.

Références

1. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1975 ; 46 : 219-34.
2. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981 ; 48 : 198-206.
3. Montserrat E, Sanchez-Bisno J, Vinolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia : analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 1986 ; 62 : 567-75.
4. Raphael M, Chastang C, Binet JL. Is bone marrow biopsy a prognostic parameter in B-CLL? *Nouv Rev Fr Hematol* 1988 ; 30 : 377-8.
5. Melo JV, Catovsky D, Gregory WM, Galton DA. The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. IV. Analysis of survival and prognostic features. *Br J Haematol* 1987 ; 65 : 23-9.
6. French cooperative group on chronic lymphocytic leukaemia. Prognostic and therapeutic advances in CLL management : the experience of the French Cooperative Group. *Semin Hematol* 1987 ; 24 : 275-90.
7. Keating MJ, Lerner S, Kantarjian H, Freireich EJ, O'Brien S. The serum β 2microglobuline (β 2M) level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Blood* 1998 ; 86 : 606a.
8. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, *et al.* Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, non smoldering chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1999 ; 95 : 1732-7.
9. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, *et al.* Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1996 ; 88 : 4259-64.
10. Döhner H, Stingelbauer S, Benner A, *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukaemia. *N Engl J Med* 2000 ; 343 : 1910-6.
11. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Döhner H, German CLL Study Group (GCLLSG). Chronic lymphocytic leukemia. Genetics of chronic lymphocytic leukemia : genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 2002 ; 16 : 993-1007.
12. Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, *et al.* Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006 ; 107 : 742-51.
13. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL : a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgVH statut and immunophenotyping. *Leukemia* 2007 ; 21 : 2442-51.
14. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V (H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1999 ; 94 : 1848-54.
15. Damle RN, Wasil T, Fais F, *et al.* Immunoglobulin V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1999 ; 94 : 1840-7.
16. Ibrahim S, Keating M, Do KA, *et al.* CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 2001 ; 98 : 181-6.
17. Gentile M, Mauro FR, Calabrese E, *et al.* The prognostic value of CD38 expression in chronic lymphocytic leukaemia patients studied prospectively at diagnosis : a single institute experience. *Br J Haematol* 2005 ; 130 : 549-57.
18. Crespo M, Bosch F, Villamor N, *et al.* ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 1764-75.
19. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, *et al.* ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukaemia. *N Engl J Med* 2004 ; 351 : 893-901.
20. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, *et al.* ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004 ; 363 : 105-11.
21. Tchirkov A, Chateaux C, Magnac C, *et al.* hTERT expression and prognosis in B- chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol* 2004 ; 15 : 1476-80.
22. Grabowski P, Hultdin M, Karlsson K, *et al.* Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. *Blood* 2005 ; 105 : 4807-12.
23. Heintel D, Kroemer E, Kienle D, *et al.*, German CLL Study Group. High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA is associated with unmutated IGVH gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2004 ; 18 : 756-62.
24. Oppezzo P, Vasconcelos Y, Settegrana C, *et al.* The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005 ; 106 : 650-7.
25. Koller C, Bekele BN, Zhou X, *et al.* Plasma thrombopoietin compared with immunoglobulin heavy-chain mutation status as a predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006 ; 108 : 1001-6.
26. Molica S, Cutrona G, Vitelli G, *et al.* Markers of increased angiogenesis and their correlation with biological parameters identifying high-risk patients in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2007 ; 31 : 1575-8.
27. Véronèse L. Intérêt pronostique et mécanismes moléculaires de l'expression de MCL-1, IL-6 et VEGF dans la leucémie lymphoïde chronique. Thèse de Médecine : Clermont-Ferrand 1, 2007.
28. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, *et al.* MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005 ; 353 : 1793-801.
29. Véronèse L, Tournilhac O, Verrelle P, *et al.* A. Low MCL-1 mRNA expression correlates with prolonged survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007 ; (Nov : 29 [Epub ahead of print]).
30. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, *et al.* International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2007 ; 21 : 956-64.

2. AUTRE ARTICLE PUBLIE DANS LE DOMAINE DE LA LLC

ARTICLE 6 (travail collaboratif du Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique)

E CHAPIRO, N LEPORRIER, I RADFORD-WEISS, C BASTARD, H MOSSAFA, D LEROUX, I TIGAUD, M DE BRAEKELEER, C TERRE, F BRIZARD, E CALLET-BAUCHU, S STRUSKI, **L VERONESE**, S FERT-FERRER, S TAVIAUX, C LESTY, F DAVI, H MERLE-BERAL, , OA BERNARD, L SUTTON, SD RAYNAUD, F NGUYEN-KHAC. **Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated Chronic Lymphocytic Leukemia at advanced stages.** *Leuk Res* 2010; 34(1): 63-8

Introduction : Les techniques de CGH et de SNP arrays constituent de nouveaux outils d'étude du génome, qui permettent de contourner les limites de la cytogénétique conventionnelle. Pour tenter d'identifier de nouvelles anomalies récurrentes, 86 patients atteints de LLC en stade B et C ont été étudiés à l'aide de la puce GenoSensor Array-300.

Résultats : Des déséquilibres génomiques ont été mis en évidence chez les 78 patients ayant généré des résultats interprétables ; 611 variations du nombre de copies ont été décrits, plus fréquemment des pertes (n=343) que des gains (n=268). Les déséquilibres les plus fréquents étaient les délétions 13q, 11p, 14q, 1p, 11q, 6q, 17p et les gains en 2p, 1q, 12q, 15q et 12p. De façon intéressante, 22 patients (soit 28%) présentaient un gain partiel ou total du bras court du chromosome 2. Cette anomalie était associée à la présence d'un caryotype anormal, d'une délétion 6q, d'un gain en 1p et d'un statut des IgV_H non muté. Des gains de *MYCN* ont été observés chez 8 patients, des gains de *MSH2* chez 9 patients et des gains de *REL* chez 8 patients. L'étude de la transcription de *MYCN* et *REL* par RQ-PCR a permis de mettre en évidence une augmentation significative de l'expression de *MYCN* chez les patients porteurs d'un gain du locus correspondant (p=0.0006).

Conclusion : Ce travail a permis de mettre en évidence une nouvelle anomalie récurrente, le gain du bras court du chromosome 2, qui est fréquente au cours des LLC évoluées et qui pourrait constituer un marqueur péjoratif de progression de la maladie. Par ailleurs, le gain de *MYCN*, un oncogène situé en 2p, est significativement corrélé à une augmentation d'expression de l'ARNm de *MYCN*, ce qui suggère un rôle de ce gène dans la physiopathologie de la LLC.



Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages

Elise Chapiro^{a,b}, Nathalie Leporrier^c, Isabelle Radford-Weiss^{b,d}, Christian Bastard^e, Hossein Mossafa^f, Dominique Leroux^g, Isabelle Tigaud^h, Marc De Braekeleerⁱ, Christine Terré^j, Françoise Brizard^k, Evelynne Callet-Bauchu^h, Stéphanie Struski^l, Lauren Veronese^m, Sandra Fert-Ferrerⁿ, Sylvie Taviaux^o, Claude Lesty^a, Frédéric Davi^a, Hélène Merle-Béral^a, Olivier A. Bernard^b, Laurent Sutton^p, Sophie D. Raynaud^q, Florence Nguyen-Khac^{a,b,*}

^a Service d'hématologie biologique, CHU Pitié-Salpêtrière, univ Paris 6, France

^b INSERM EMI0210, Necker-Enfants Malades, Paris, France

^c Laboratoire de cytogénétique, CHU de Caen, France

^d Laboratoire de cytogénétique, CHU Necker-Enfants Malades, Paris, France

^e Laboratoire de génétique oncologique, Centre H Becquerel, Rouen, France

^f Laboratoire Pasteur-Cerba, Cergy-Pontoise, France

^g Laboratoire d'hématologie cellulaire et moléculaire, CHU Grenoble, France

^h Service d'hématologie biologique, CH Lyon-Sud, Lyon, France

ⁱ Service de cytogénétique, CHU Brest, France

^j Laboratoire de cytogénétique, CH Versailles, France

^k Laboratoire d'hématologie, CHU de Poitiers, France

^l Génétique des hémopathies, Hôpital Purpan, Toulouse, France

^m Cytogénétique médicale, CHU Clermont-Ferrand, France

ⁿ Laboratoire de génétique chromosomique, CH Chambéry, France

^o Génétique moléculaire et chromosomique, CHU Montpellier, France

^p Service d'hématologie, Hôpital V Dupouy, Argenteuil, France

^q Laboratoire d'oncohématologie, Hôpital Pasteur, Nice, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 February 2009

Received in revised form 25 February 2009

Accepted 28 March 2009

Available online 29 April 2009

Keywords:

2p gain
CLL
MYCN
REL

ABSTRACT

Using array-based CGH, we identified 2p gain in 22/78 (28%) untreated Binet stages B/C CLL, which was the second most frequent copy number change after 13q deletion. It never occurred as a sole abnormality and was associated with other changes (6q deletion; 1p gain). The region of 2p gain frequently included two oncogenes, *REL* and *MYCN*. All patients with gain of *REL* were unmutated for *IGHV* ($p = 0.03$). Gain of *MYCN* was associated with increased mRNA expression ($p = 0.005$), suggesting a pathogenic role for *MYCN*. Gain of 2p appears to be a marker of progression and may contribute to the poor prognosis.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by a variable clinical course, patients being classified into low-risk (Binet stage A) and high-risk (stages B/C) [1]. At the genetic level, CLL

is heterogeneous, showing a variety of genetic aberrations. Chromosomal changes can be detected by conventional cytogenetics (CC) or fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Using FISH, the most frequent recurrent abnormalities are 13q deletion, trisomy 12, 11q deletion, 17p deletion and 6q deletion. Deletions of 11q and 17p are associated with shorter overall survival [2]. High-resolution techniques such as array-based comparative genomic hybridization (aCGH) and single nucleotide polymorphisms arrays (SNPA) overcome some of the methodological limitations of CC and FISH. Using aCGH, we identified the gain of the short arm of chromosome 2 (2p) as a frequent recurring chromosome aberration, present in 28% of untreated patients with stages B/C CLL.

* Corresponding author at: Hôpital Pitié-Salpêtrière, Pavillon Laveran 1^{er} étage, 83 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Tel.: +33 1 42 16 02 16; fax: +33 1 42 16 02 10.

E-mail address: Florence.nguyen@psl.aphp.fr (F. Nguyen-Khac).

2. Materials and methods

We studied 86 untreated Binet stages B/C CLL patients, aged between 18 and 65, enrolled onto a prospective clinical trial (randomized phase III trial comparing autologous stem cell transplantation to conventional chemotherapy in CLL). A subset of 18 Binet stage A CLL, diagnosed at Pitié-Salpêtrière Hospital, was analyzed by aCGH in parallel. All patients signed an informed consent.

The diagnosis was based on morphological criteria and immunophenotyping (Matutes' score 4/5) [3]. CC was performed on peripheral blood or bone marrow using standard techniques (72 h 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)-stimulated) for 81 patients. Screening by interphase and metaphase FISH for the most common abnormalities in CLL was carried out on 86 cases using a range of commercial probes (CEP12, 13q14 (D13S319), ATM, P53 Abbott, Rungis; 13q14 (D13S319-D13S25) Amplitech, Compiègne, France).

To confirm the 2p abnormalities detected by aCGH, FISH was performed on interphase nuclei (a minimum of 100 nuclei were counted) or metaphases when available. A set of specific probes was used: LSIN-MYC/CEP2 (Abbott, Rungis, France); N-myc/alphasat. 2 (Qbiogene, Illkirch, France) for MYCN locus (2p24), BAC clones RP11-436K12 and RP11-1084A21 for MSH2 locus (2p22), RP11-1118K19 and RP11-373L24 for REL locus (2p13).

Array CGH was performed using DNA from peripheral blood samples, hybridized onto the *GenoSensor Array-300* chip (Abbott). Each chip contained 287 clones, spotted in triplicate, which included known oncogenes and suppressor tumor genes as well as other regions of interest in oncology. Commercially available reference DNA (Promega, France) was used. DNA samples from patients were labelled as previously described, and compared with reference DNA of the same sex [4,5]. The median proportion of tumor cells was 85% (range 39–98). The arrays were analyzed using a microarray reader system (Genosensor Reader and Genosensor Reader Software, Abbott). Mean intensities were measured from the green and red image planes, the background level was subtracted and the mean ratio of green to red signal was determined. The normalized ratio for each target was calculated relative to the modal DNA copy number, and the statistical significance of each change was reported as a *p* value. A *p* value ≤ 0.005 indicated a significant difference between the copy number of the target and the modal clones. Ratios more than the mean plus two standard deviations (~ 1.2) and less than the mean minus two standard deviations (~ 0.8) with *p* ≤ 0.005 were considered as gain and loss, respectively [6].

mRNA was measured by real-time quantitative reverse transcription (qRT-PCR), using a commercial assay (Applied Biosystems). Each sample was tested in duplicate and normalized with respect to ABL1 expression. *IGHV* status was determined as previously described [7]. Statistical analyses were performed using χ^2 , Fischer exact and Mann–Whitney tests.

3. Results

Among 86 B/C CLL patients analyzed by aCGH, a successful result was achieved in 78 (91%). Samples failed as a result of poor DNA quality. For each array, clones below the specified quality parameters were excluded. The median exclusion was 1 clone per chip (range 0–27).

The chip data were validated with respect to the common abnormalities in CLL by comparison to CC or FISH (Table S1). When the proportion of cells bearing a clonal genomic aberration was identified by FISH in $\geq 30\%$ of cells, the abnormality could also be detected by aCGH. When the percentage of abnormal cells ranged between 10% and 30%, the abnormality was not always visible by aCGH. A total of 56 common imbalances were detected among the 78 CLL samples by aCGH: 13q14 deletions (*n* = 31, 40%), 11q22 deletions (*n* = 11, 14%), trisomy 12q (*n* = 10, 13%), 17p13 deletion (*n* = 4, 5%), of which 53 (94.6%) were confirmed by FISH and/or CC. For 13q14 deletion, it was possible to differentiate between bi- and mono-allelic loss from correlation between the ratio of the bi-allelic loss (mean: 0.4; range: 0.26–0.61), compared to mono-allelic loss (mean: 0.69; range: 0.56–0.85) (*p* < 0.0001). This was also validated by FISH. No false positive results were observed. From these observations, we were confident that other copy number change within the same parameters would require no further FISH validation.

Chromosomal imbalances were detected in all 78 cases. Overall, 611 copy number changes were observed, with deletions (*n* = 343) more frequent than gains (*n* = 268). The median number of abnormalities per case was 7 (range 1–43). The most common imbalances were deletions involving chromosome arms 13q (*n* = 31, 40%), 11p (*n* = 17, 22%), 14q (*n* = 17, 22%), 1p (*n* = 13, 17%), 11q (17%, *n* = 13), 6q (17%, *n* = 13), 17p (15%, *n* = 12), and gains in chromosomes 2p (28%, *n* = 22), 1q (*n* = 15, 19%), 12q (*n* = 10, 13%), 15q (*n* = 9, 11%), 12p (*n* = 7, 9%) (Fig. 1). Surprisingly, the most frequent abnormality after 13q deletion was gain of 2p. Among the 78 patients, 22 (28%) showed a full or partial gain of 2p; of which 15 (68%) had an abnormal CC

Table 1

Patients with 2p gain: conventional cytogenetic, FISH and partial aCGH results.

Patients	Karyotypes	FISH tri12q	FISH del13q14	FISH del11q22	FISH del17p13	CGH del6q	CGH 1p gain	CGH 1q gain
1	46,XY,ins(4;2)(q28;q11q21)[6]/46,XY[14]	–	+	–	–	–	–	–
2	45,XY,-8,-8,-15,-17,-21,-22,+r,mar1,+mar2,+mar3,+mar4[12]/46,XY[7]	–	–	–	+	–	–	–
3	46,XY,t(1;9)(q44;q31-32)[5]/46,XY[18]	–	+	–	–	–	–	+
4	47,XY,+12[1]/49,idem,+18,+19[15]/46,XY[4]	+	–	–	–	–	+	+
5	46,XY[21]	–	+	+	–	–	–	–
6	46,XY[40]	–	–	+	–	+	–	–
7	46,XY,del(6)(q14)[6]/46,XY[14]	–	–	–	–	+	–	–
8	46,XY,del(11)(q23),add(14)(p11)[3]/46,sl,add(22)(q13)[10]/46,sl,del(1)(q22),add(13)(q34),add(14)(q31)[7]/46,XY[19]	–	+	+	–	–	–	–
9	46,XY,del(13)(q21q31)[10]/46,XY[22]	–	+	Nd	Nd	–	–	–
10	46,XY[40]	–	–	–	–	–	+	–
11	46,XY,del(11)(q23)[6]/46,XY[14]	–	+	+	–	–	+	+
12	46,XY[40]	–	+	–	–	–	–	+
13	46,XX,-16,-17,-20,+3mar[4]	–	–	–	–	–	–	–
14	46,XY,del(6)(q714q724),del(11)(q14q24)[2]/46,XY[23]	–	–	+	–	+	–	+
15	46,XY,t(14;19)(q32;q13)[13]/46,idem,del(6q)[4]/46,XY[3]	–	–	–	–	+	–	–
16	46,XY[40]	–	–	–	–	+	+	+
17	46,XY,del(13)(q13q21)[1]/46,XY[3]	–	+	–	–	+	–	–
18	46,XY,del(11)(q14q25)[7]/46,XY[26]	Nd	+	+	–	–	–	–
19	46,XY,add(8q)[8]/46,XY[19]	–	+	–	–	+	–	–
20	46,XY[32]	–	+	–	–	–	–	–
21	46,XY,del(11)(q23)[7]/47,idem,+mar[6]/46,XY[4]	–	+	+	–	–	–	–
22	46,XY[20]	– ^a	–	–	–	–	–	+

CC was performed on peripheral blood or bone marrow samples with usual techniques (72 h, TPA-stimulated). FISH was done using commercial probes (CEP12, 13q14 (D13S319), ATM(11q22), TP53(17p13) Abbott, Rungis, France; 13q14(D13S319-D13S25) Amplitech, Compiègne, France), on interphase nuclei (at least 100 counted nuclei). +: positive (>5% of cells); -: negative. Nd: not done.

^a Partial trisomy 12q was detected by aCGH.

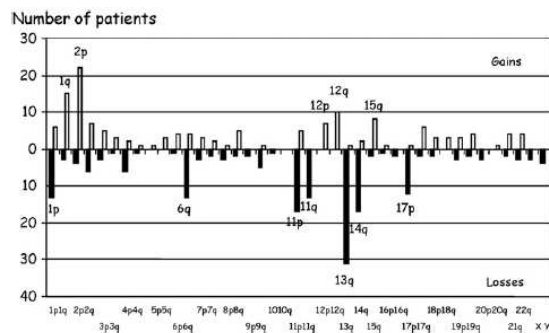


Fig. 1. Number of patients with abnormalities per chromosome arm. This graph depicts the number of patients with gains or losses per chromosome arm (short arm p, long arm q). 78 CLL patients have been analyzed. The most common imbalances were losses involving chromosomes 13q (40%, $n=31$), 11p (22%, $n=17$), 14q (22%, $n=17$), 1p (17%, $n=13$), 11q (17%, $n=13$), 6q (17%, $n=13$), 17p (15%, $n=12$), and gains in chromosomes 2p (28%, $n=22$), 1q (19%, $n=15$), 12q (13%, $n=10$), 15q (11%, $n=9$), 12p (9%, $n=7$).

with no recognized 2p abnormalities (Table 1). FISH detected 13q14 deletion in 12/22 (54%) cases, 11q22 deletion (*ATM*) in 7/21 (33%), trisomy 12 in 1/21 (5%), 17p13 deletion (*TP53*) in 1/21 (5%). Using aCGH, 7/22 (32%) had 6q deletion, 7/22 (32%) 1q gain, 4/22 (18%) 1p gain, and partial trisomy 12q was detected in one additional patient (patient 22) (Table 1).

We compared the distribution of these abnormalities between CLL with and without 2p gain. CLL with 2p gain harbored more unbalanced translocations (23% (5/22) vs. 12% (6/48), $p=0.2$), more *ATM* deletion (33% (7/21) vs. 22% (12/54), $p=0.15$) and 1q gain (32% (7/22) vs. 14% (8/56), $p=0.07$). They also significantly exhibited more 6q deletion (32% (7/22) vs. 11% (6/56), $p=0.02$) and 1p gain (18% (4/22) vs. 4% (2/56), $p=0.03$) (Tables 1 and 2).

There were six clones on 2p, including one each specific for *MYCN*, *MSH2*, and *REL* genes (Table 3). No minimally gained region was identified, although there was some overlap of gains of these genes (patients 5, 8, 13 had gain of all three genes). Gains of *MYCN*

Table 2
Distribution of abnormalities among patients with and without 2p gain.

	2p gain + ($n=22$)	2p gain – ($n=56$)	p
Abnormal karyotype	15/22 (68%)	24/48 (50%)	ns
Complex karyotype (≥ 3 abnormalities)	8/22 (36%)	12/48 (25%)	ns
Translocations ^a	7/22 (32%)	15/48 (31%)	ns
Unbalanced translocations ^a	5/22 (23%)	6/48 (12%)	ns
Trisomy 12q (FISH/CGH)	2/22 (9%)	8/56 (14%)	ns
del13q14 (FISH)	12/22 (54%)	29/55 (53%)	ns
del11q22 (<i>ATM</i>) (FISH)	7/21 (33%)	12/54 (22%)	ns
del17p13 (<i>TP53</i>) (FISH)	1/21 (5%)	3/54 (5%)	ns
del6q (CGH)	7/22 (32%)	6/56 (11%)	0.02
1p gain (CGH)	4/22 (18%)	2/56 (4%)	0.03
1q gain (CGH)	7/22 (32%)	8/56 (14%)	ns
Unmutated <i>IGHV</i> status	16/22 (73%)	34/54 (63%)	ns
	<i>REL</i> gain + ($n=8$)	<i>REL</i> gain – ($n=70$)	
Unmutated <i>IGHV</i> status	8/8 (100%)	42/68 (62%)	0.03
<i>REL</i> expression ^b : median	1.4 ($n=6$)	1.2 ($n=10$)	ns
	<i>MYCN</i> gain + ($n=8$)	<i>MYCN</i> gain – ($n=68$)	
Unmutated <i>IGHV</i> status	6/8 (75%)	43/66 (65%)	ns
<i>MYCN</i> expression ^b : median	13.6 ($n=4$)	1.2 ($n=17$)	0.005

ns: not significant; n : number of patients.

^a Observed by conventional cytogenetic.

^b Each sample was tested in duplicate, and normalized with respect to *ABL1* expression.

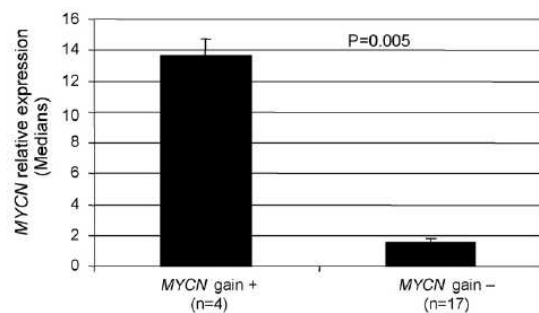


Fig. 2. Normalized expression of *MYCN* in CLL with and without gain of *MYCN*. *MYCN* expression was compared among patients with gain of *MYCN* (5, 8, 12, 22) and patients with 2p gain excluding *MYCN* (2, 6, 7, 10, 11, 14, 16) and without 2p gain ($n=10$). There was no *MYCN* different expression between patients without *MYCN* gain, having or not 2p gain.

were observed in 10% patients (8/76), gains of *MSH2* in 11% (9/78), and gains of *REL* in 10% (8/78). We confirmed the gains of these loci in samples with available material, using FISH (Table 3). In three patients with abnormal metaphases, we observed trisomy 2p, resulting from unbalanced translocations: t(2;21) (patient 2), t(2;14) (patient 8), and t(2;?) (patient 13). Interphase FISH confirmed the presence of additional copies of *MYCN* in three patients (5, 19, with two additional copies in patient 21), an additional copy of *REL* in patient 6, and an additional copy of *MSH2* in patient 5. These abnormalities were observed in only a fraction of cells by FISH, thus ruling out that they were polymorphic variations at the same time as confirming that 2p gain was an acquired abnormality.

MYCN and *REL* are known oncogenes, therefore we used qRT-PCR to measure their transcription level. No difference in *REL* expression was observed between groups with and without gain of *REL* (median: 1.4 vs. 1.2). Conversely, there was an 11-fold increase of *MYCN* normalized expression in patients with gain of *MYCN* compared to CLL without gain of *MYCN* (median: 13.6 vs. 1.2, $p=0.005$) (Fig. 2).

Of note was that the majority of cases with 2p gain (16/22, 73%) expressed unmutated *IGHV* genes. The 8 patients (100%) with gain of *REL* were all unmutated, which was significantly different when compared to patients without gain of *REL* (62% (42/68), $p=0.03$) (Tables 2 and 3).

4. Discussion

Array CGH is a sensitive tool to study genomic imbalances, which we applied to a homogenous series of untreated CLL at advanced stages to investigate their chromosomal abnormalities. We observed a recurring chromosome aberration, the full/partial gain of the short arm of chromosome 2, at a high frequency of 28%, which has not been previously reported. Gain of 2p was detected by aCGH, but was not observed by CC. This occurred either because the abnormality formed part of a complex karyotype or that it was submicroscopic. Using FISH probes covering the three loci *MYCN*, *MSH2* and *REL*, we confirmed the gain of all three genes.

Gains of 2p at low frequencies (<5%) have been previously reported in CLL [8–11]. This may also reflect the cryptic nature of the 2p gain, which we have uncovered. In addition, CLL cohorts usually include a high proportion of Binet stages A samples. Our analyses of 18 stages A CLL patients by aCGH did not reveal any cases with gain of 2p (data not shown). This is significantly different from stage B/C CLL in our series (0% (0/18) vs. 28% (22/78), $p=0.01$). Gain of 2p has been associated with karyotype progression [10,12]. Actually 2p gain did not occur as a sole abnormality in our series. Fifteen

Table 3
Abnormalities of the short arm of chromosome 2: CGH, FISH data, and IGHV status.

Patients	CGH 2ptel (telomeric)	CGH 2ptel	CGH 2p24 MYCN	CGH 2p22 MSH2	CGH 2p13 REL	CGH 2p12 (centromeric)	FISH MYCN	FISH MSH2	FISH REL	FISH (metaphases)	IGHV
1	0.88	0.99	<u>1.2/0.002</u>	0.95	0.95	1.02	Failure				UnM
2	Failure	1.09	1.14	<u>1.4/0.0001</u>	<u>1.34/0.0005</u>	<u>1.29/0.001</u>		3 signals (50%)	3 signals (66%)	der(21)t(2;21)	UnM
3	1.04	1	1.01	<u>1.12/0.005</u>	1.09	0.99		Nd			UnM
4	1.12	1	1.02	<u>1.26/0.0005</u>	1.14	0.99		Nd			M
5	<u>1.23/0.0001</u>	<u>1.38/0.0001</u>	<u>1.54/0.0001</u>	<u>1.30/0.0001</u>	<u>1.32/0.0001</u>	<u>1.31/0.0001</u>	3 signals (68%)	3 signals (60%)	Failure		UnM
6	0.88	0.97	1.01	1.09	<u>1.19/0.001</u>				Nd		UnM
7	0.95	1.02	0.96	1.04	<u>1.16/0.005</u>	0.99			Failure		UnM
8	<u>1.43/0.0001</u>	<u>1.49/0.0001</u>	<u>1.24/0.0001</u>	<u>1.64/0.002</u>	<u>1.40/0.0001</u>	1.03	3 signals (88%)	3 signals (90%)	3 signals (only metaphases)	der(14)t(2;14)	UnM
9	<u>1.24/0.005</u>	<u>1.39/0.0001</u>	1.01	1	0.96	0.99					M
10	0.98	1.02	1.03	1.1	<u>1.20/0.005</u>	1.01			Nd		UnM
11	<u>1.27/0.01</u>	1.18	1.02	<u>1.3/0.002</u>	1.09	1.02		Nd			M
12	0.96	1.03	<u>1.12/0.0005</u>	1.05	1.05	1.05	Nd				M
13	<u>1.21/0.0001</u>	Failure	<u>1.27/0.0001</u>	<u>1.28/0.0001</u>	<u>1.4/0.0001</u>	<u>1.27/0.0001</u>	3 signals (51%)	3 signals (47%)	3 signals (45%)	der(?)t(2;?)	UnM
14	<u>1.26/0.01</u>	<u>1.34/0.0005</u>	1.1	1.05	1.01	1.01					UnM
15	0.95	0.97	1.1/0.01	1.04	<u>1.12/0.005</u>	0.96			Failure		UnM
16	<u>1.35/0.0001</u>	1.01	1.23	1.18	1.05	1.02					UnM
17	Failure	1.11	0.89	<u>1.2/0.005</u>	1.17	1.09		Nd			UnM
18	1	0.99	1.06	<u>1.16/0.005</u>	0.96	1.07		Nd			UnM
19	0.93	1.02	<u>1.18/0.001</u>	1	1.04	1.02	3 signals (29%)				UnM
20	1.01	<u>1.27/0.001</u>	0.89	1.1	0.82	0.96					M
21	1.04	1.07	<u>1.21/0.0001</u>	1.12	1.09	1.1	4 signals (10%)*				UnM
22	Failure	0.97	<u>1.26/0.001</u>	1.09	1.07	1.03	Failure				M

FISH on interphasic nuclei (at least 100 counted nuclei) or metaphases. Nd: not done. M: mutated. UnM: unmutated. For the CGH data, normalized ratios are indicated, with the *p* value. Copy number changes with *p* value ≤ 0.005 are considered significant and are underlined. *p* value = 0.01 is not significant. *p* values > 0.01 are not indicated.

* This patient harbors four copies of the MYCN locus, which probably explains why this abnormality was detected by aCGH, despite the low percentage of cells bearing the abnormality.

patients had abnormal CC, 4 of which were complex (≥ 3 abnormalities). Among the 7 patients with normal CC, 3 showed one or more FISH abnormalities, and the remaining 4 had two or more CGH abnormalities. In addition, 2p gain may contribute to the natural progression of the disease together with additional chromosomal abnormalities, which may play a role in the pathogenesis of CLL. Interestingly, in support of this, 2p gains were significantly associated with a high frequency of 6q deletion and 1p gain, suggesting a specific oncogenic cooperation between these abnormalities.

In our series, the majority (73%) of CLL with 2p gain expressed unmutated *IGHV* genes, which is a higher percentage than patients without 2p gain. The difference was not significant, but our cohort included only Binet stage B/C CLL which is naturally enriched with unmutated cases. Gain of 2p may contribute to the poor prognosis associated with unmutated *IGHV*.

We used an aCGH platform with probes directed specifically to regions of interest in oncology, including known oncogenes and suppressor tumor genes. Three genes *MSH2*, *MYCN*, *REL*, found to be gained within the region of interest on 2p, could be potential targets of this abnormality. *MSH2* is involved in DNA mismatch repair with a role in maintaining the fidelity of genomic replication. Deficiency of *MSH2* is responsible for microsatellite instability in some hereditary nonpolyposis colorectal tumors and other human tumors [13]. Therefore, *MSH2* is unlikely to be an important target of 2p gain in CLL.

The *MYCN* oncogene is a member of the *MYC* family of transcription factors, amplified in neuroblastoma and a variety of neuroectodermal tumors. Its activation in non-hodgkin lymphoma has remained anecdotal so far [14]. Schwaenen et al. described a gain of *MYCN* in 5/106 (~5%) CLL and one Mantle Cell Lymphoma (MCL), associating with an increase in *MYCN* mRNA [8]. Recently two blastoid MCL with an t(2;14)(p24;q32) translocation involving *IGH* and targeting *MYCN* and resulting in up-regulation of *MYCN* mRNA have been reported [15]. We found 10% of CLL with gain of *MYCN* in our series, which we confirmed to be significantly associated with a high transcript level.

Using high-density SNP, Pfeifer et al. reported a common minimal region of gain of 3.5-Mb spanning the *REL* and *BCL11A* oncogenes in 5.7% of CLL patients [11]. The four cases were unmutated. The authors suggested that 2p gain may have contributed to the poor prognosis in these patients. In the same way, Forconi et al. found that *BCL11A/REL* amplification was frequent (39%) among CLL harboring 17p deletion, and they identified this subgroup to have a significantly shorter overall survival [16]. We showed gain of *REL* in 10% Binet stage B/C CLL which were also unmutated. A single case harbored a *TP53* deletion.

Gains of the same region 2p12–16 have been reported in various subtypes of B-lymphomas (diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), follicular lymphoma (FL), marginal zone lymphoma), and in Hodgkin disease (HD). In HD, 2p gains involving the *REL* locus seem to correlate with nuclear c-REL protein accumulation [17]. However, in FL or DLBCL, there is no systematic correlation between the relative levels of *REL* amplification, *REL* mRNA and nuclear accumulation [18]. With regard to *REL* transcript in our series, we showed no differences between CLL with and without gain of *REL*, suggesting that *REL* may not be the important target of 2p gain in CLL.

In this study, we used a relatively low-resolution array, with a limited coverage of the 2p. However, to the best of our knowledge, other reports of CLL using higher resolution arrays (10, 50, and 250K) have failed to define 2p abnormalities more precisely [11,16]. This underscores the fact that most genomic imbalances involving 2p might be located in the regions covered by the few probes present on the chip.

In conclusion we report 2p gain as a recurrent chromosomal abnormality, frequently observed in advanced stages of untreated

CLL. It may represent a second event occurring during the natural progression of the disease, with a role in the pathogenesis. Gain of 2p is never seen in isolation, and it is significantly associated with 6q deletion and 1p gain. It frequently includes 2 known oncogenes, *REL* and *MYCN*, the latter showing a significant increase in RNA expression, suggesting a pathogenic role for *MYCN*. The treatment response and the longer follow-up of the patients will provide indications of its prognostic value.

Conflicts of interest

The authors report no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was partly supported by a Roche France grant. We thank L. Merlin and J. Ong for technical assistance, K. Maloum for his support, S. Béthery-Dostes for her help in improving the manuscript.

Contributors: EC performed research, NL, I R-W, CB, HM, DL, IT, MdB, CT, FB, EC-B, SS, LV, SF-F, ST, CL, SDR performed cytogenetics, CL performed statistical analysis, FD provided *IGHV* status, HM-B provided immunophenotype data, LS coordinated the clinical trial and provided samples, FD, OAB, SDR revised the manuscript, FN-K designed research and wrote the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.leukres.2009.03.042.

References

- [1] Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguat H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198–206.
- [2] Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910–6.
- [3] Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, Seon BK, Catovsky D. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* 1997;108:378–82.
- [4] Kawanishi H, Takahashi T, Ito M, Watanabe J, Higashi S, Kamoto T, Habuchi T, Kadowaki T, Tsujimoto G, Nishiyama H, Ogawa O. High throughput comparative genomic hybridization array analysis of multifocal urothelial cancers. *Cancer Sci* 2006;97:746–52.
- [5] Callier P, Faivre L, Thauvin-Robinet C, Marle N, Mosca AL, D'Athis P, Guy J, Masurel-Paulet A, Joly L, Guiraud S, Teyssier JR, Huet F, Mugneret F. Array-CGH in a series of 30 patients with mental retardation, dysmorphic features, and congenital malformations detected an interstitial 1p22.2–p31.1 deletion in a patient with features overlapping the Goldenhar syndrome. *Am J Med Genet A* 2008;146A:2109–15.
- [6] Larrabee PB, Johnson KL, Pestova E, Lucas M, Wilber K, LeShane ES, Tantravahi U, Cowan JM, Bianchi DW. Microarray analysis of cell-free fetal DNA in amniotic fluid: a prenatal molecular karyotype. *Am J Hum Genet* 2004;75:485–91.
- [7] Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stella S, Guida G, Michel A, Crespo M, Laoutaris N, Montserrat E, Anagnostopoulos A, Dighiero G, Fassin A, Caligaris-Cappio F, Davi F. Geographic patterns and pathogenetic implications of *IGHV* gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the *IGHV3-21* gene. *Blood* 2005;105:1678–85.
- [8] Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S, Salvi T, Wrobel G, Radlwimmer B, Kestler HA, Haslinger C, Stilgenbauer S, Dohner H, Bentz M, Lichter P. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:1039–44.
- [9] Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, Hallek M, Wendtner CM. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;107:742–51.
- [10] Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, *IgV(H)* status and immunophenotyping. *Leukemia* 2007;21:2442–51.

- [11] Pfeifer D, Pantic M, Skatulla I, Rawluk J, Kreutz C, Martens UM, Fisch P, Timmer J, Veelken H. Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood* 2007;109:1202–10.
- [12] Bea S, Lopez-Guillermo A, Ribas M, Puig X, Pinyol M, Carrio A, Zamora L, Soler F, Bosch F, Stilgenbauer S, Colomer D, Miro R, Montserrat E, Campo E. Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). *Am J Pathol* 2002;161:957–68.
- [13] Seifert M, Reichrath J. The role of the human DNA mismatch repair gene hMSH2 in DNA repair, cell cycle control and apoptosis: implications for pathogenesis, progression and therapy of cancer. *J Mol Histol* 2006;37:301–7.
- [14] Schwab M. MYCN in neuronal tumours. *Cancer Lett* 2004;204:179–87.
- [15] Wlodarska I, Dierickx D, Vanhentenrijk V, Van Roosbroeck K, Pospisilova H, Minnei F, Verhoef G, Thomas J, Vandenberghe P, De Wolf-Peters C. Translocations targeting CCND2, CCND3, and MYCN do occur in t(11;14)-negative mantle cell lymphomas. *Blood* 2008;111:5683–90.
- [16] Forconi F, Rinaldi A, Kwee I, Sozzi E, Raspadori D, Rancoita PM, Scandurra M, Rossi D, Deambrogi C, Capello D, Zucca E, Marconi D, Bomben R, Gattei V, Lauria F, Gaidano G, Bertoni F. Genome-wide DNA analysis identifies recurrent imbalances predicting outcome in chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion. *Br J Haematol* 2008.
- [17] Barth TF, Martin-Subero JL, Joos S, Menz CK, Hasel C, Mechttersheimer G, Parwaresch RM, Lichter P, Siebert R, Moeller P. Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003;101:3681–6.
- [18] Houldsworth J, Olshen AB, Cattoretti G, Donnelly GB, Teruya-Feldstein J, Qin J, Palanisamy N, Shen Y, Dyomina K, Petlak M, Pan Q, Zelenetz AD, Dalla-Favera R, Chaganti RS. Relationship between REL amplification, REL function, and clinical and biologic features in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2004;103:1862–8.

3. AUTRES ARTICLES EN CYTOGENETIQUE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE ONCO-HEMATOLOGIQUES

ARTICLE 7

L. VERONESE, A.TCHIRKOV, C. RICHARD-PEBREL, A. LEDOUX-PILON, J. FLEURY, C. CHALETEIX, C. GOUMY, L. GOUAS, M. G. BERGER, P. VAGO P, J. O. BAY, O. TOURNILHAC. **A thrombocytosis occurring in Philadelphia positive CML in molecular response to imatinib can reveal an underlying JAK2V617F myeloproliferative neoplasm.** *Leuk Res* 2010; 34(4):e94-6

Introduction : La LMC se caractérise par la présence d'un réarrangement *BCR-ABL*, porté le plus souvent par le chromosome Philadelphie (Ph), tandis que les autres SMP, qui sont par définition Ph-, peuvent présenter dans un certain nombre de cas une mutation du gène *JAK2* (90% des PV et 50% des MF et TE). Il semblait initialement admis que la mutation *JAK2-V617F* et le réarrangement *BCR-ABL* étaient mutuellement exclusifs. Cependant, plusieurs cas de coexistence de ces 2 anomalies ont récemment été rapportés. Dans certains cas, la mutation *JAK2-V617F* précédait la survenue de la translocation (9;22), dans d'autres cas elle survenait au contraire au cours du traitement efficace d'une LMC.

Cas cliniques : Nous rapportons 2 nouveaux cas de mutations *JAK2-V617F* découvertes chez des patients atteints de LMC Ph+ en cours de traitement. Nous comparons les caractéristiques de ces patients avec les cas cliniques précédemment rapportés.

Conclusion : Ces 2 observations démontrent que l'apparition ou la persistance d'une thrombocytose au cours du traitement bien conduit d'une LMC peut révéler un autre SPM Ph-*JAK2+* sous-jacent. Ces cas soulèvent la question de savoir si ces pathologies surviennent indépendamment l'une de l'autre, représentant la transformation de deux cellules souches normales, ou si la mutation *JAK2-V617F* survient dans une cellule souche appartenant au clone de LMC.



Letter to the Editor

A thrombocytosis occurring in Philadelphia positive CML in molecular response to imatinib can reveal an underlying $JAK2^{V617F}$ myeloproliferative neoplasm

1. Introduction

Myeloproliferative neoplasms (MPN) such as primary myelofibrosis (PMF), polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET) are clonal hematopoietic diseases which have been separated by definition from Philadelphia positive chronic myeloid leukemia (Ph+ CML). Recently, an acquired gain-of-function mutation (V617F) in the $JAK2$ gene has been discovered in the majority (up to 90%) of patients with PV and approximately half of the patients with PMF and ET [1–3]. No $JAK2^{V617F}$ mutation was initially found in Ph+ CML, suggesting that $JAK2$ mutation and $BCR-ABL$ rearrangement resulting from Ph translocation are mutually exclusive [4]. More recently, several cases with the coexistence of $BCR-ABL$ fusion gene and $JAK2^{V617F}$ mutation in blood and bone marrow samples were described [5]. For these patients, $JAK2^{V617F}$ mutation either preceded the acquisition of $BCR-ABL$ translocation [6–9] or was revealed after effective treatment of Ph+ CML [10–15]. We report here two new cases of $JAK2^{V617F}$ mutation discovered in Ph+ CML patients under imatinib treatment and compare our findings with those of similar reports.

2. Case reports

Case #1: an 82-year-old female patient presented with asthenia, loss of weight, dyspnea and splenomegaly measured at 6 cm below the costal margin. The hematological parameters were as follows: white blood cells (WBC), $170 \times 10^9/L$ with a differential count of 45% neutrophils, 9% lymphocytes, 2% monocytes, 5% eosinophils, 6% basophils, 4% metamyelocytes, 13% myelocytes, 8% promyelocytes and 8% blasts; hemoglobin, 70 g/L; platelets, $365 \times 10^9/L$. At the time of diagnosis, peripheral blood cytogenetic analysis revealed a translocation (9;22)(q34;q11) in the six metaphases examined associated with the expression of a b3a2 $BCR-ABL$ mRNA detected by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Regarding the poor *performans status*, bone marrow analysis was not done. The Sokal score was 1.6. A diagnosis of Ph+ chronic phase CML was retained and hydroxycarbamide was started, shortly changed for imatinib (400 mg/day). After 5 months of imatinib therapy, white blood cell count was normalized and $BCR-ABL/ABL$ ratio dropped from 100% at diagnosis to 0.5%. However, platelet count had risen to $1110 \times 10^9/L$ without iron deficiency or inflammation, and spleen enlargement was reduced but still present (3 cm). After 12 months, the ratio $BCR-ABL/ABL$ IS (International Scale) was 0.9% while thrombocytosis ($784 \times 10^9/L$) and a mild splenomegaly (2 cm) were still present. Bone marrow trephine biopsy showed then an increased megakary-

opoiesis with stage I fibrosis. Bone marrow conventional karyotype revealed 46,XX,t(13;17)(q14;q22)[8]/46,XX,del(13q)[6]/46,XX[1]. The presence of the t(13;17) and 13q deletion was confirmed by fluorescence in situ hybridization (FISH) using multicolor karyotype and the LSI 13 RB (13q14.2) probe, respectively. Progenitor cultures showed the presence in blood of spontaneously growing colonies. Finally a $JAK2^{V617F}$ mutation was found in blood neutrophils. The ratio $JAK2^{V617F}/total JAK2$ ratio was 92%, which indicated a homozygous mutation status. The diagnosis being consistent with a coexisting $JAK2^{V617F}$ MPN and CML with a near major molecular response (MMR), imatinib was pursued and hydroxycarbamide (500 mg 3 days per week) was added along with a low dose of salicylic acid.

Retrospective analysis on fixed cells from unstimulated peripheral blood culture obtained at CML diagnosis before imatinib therapy demonstrated no 13q14 deletion while 100% of nuclei displayed a $BCR-ABL$ fusion by FISH analysis. In this sample, we detected a $JAK2^{V617F}$ mutation with a $JAK2^{V617F}/total JAK2$ ratio of 0.5% using allele-specific quantitative PCR (AS-qPCR) as previously described [16].

At 18 months of imatinib therapy, the patient was doing well, with a persistent splenomegaly (2 cm), a thrombocytosis ($559 \times 10^9/L$) and a $BCR-ABL/ABL$ IS ratio of 0.2% in blood. At 36 months, no thrombosis or hemorrhagic event had occurred, and a MMR was achieved with the $BCR-ABL/ABL$ IS ratio of 0.06%. Platelet count was within normal range ($419 \times 10^9/L$) but spleen enlargement (2 cm) persisted.

Case #2: a 62-year-old male patient presented with leukocytosis and thrombocytosis. Clinical examination was normal with no palpable spleen enlargement while a mild splenomegaly was detected using abdominal echogram (17 cm). His complete blood count was as follows: WBC, $71 \times 10^9/L$ including 53% neutrophils, 6% lymphocytes, 1.5% monocytes, 1.5% eosinophils, 6% basophils, 12% metamyelocytes, 11% myelocytes, 6% promyelocytes and 3% blasts; hemoglobin, 117 g/L; platelets, $1082 \times 10^9/L$. As a part of diagnostic evaluation of MPN, $JAK2$ mutation analysis was performed on blood neutrophils and showed a $JAK2^{V617F}/total JAK2$ ratio of 0.2%. Bone marrow *ex vivo* culture displayed autonomous growth of erythroid and megakaryocytic progenitors. Bone marrow cytogenetic analysis revealed 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[10]. Expression of a b3a2 $BCR-ABL$ mRNA was detected by RT-PCR. Trephine biopsy revealed bone marrow hyperplasia with a predominant inflation of granulopoiesis and no myelofibrosis. At that time the detection of $JAK2^{V617F}$ mutation had been considered as non-significant, and the diagnosis of Ph+ chronic phase CML was retained. The Sokal score was 1.2. Imatinib therapy was started at 400 mg/day. After 3 months, WBC and hemoglobin were within normal ranges, but thrombocytosis ($837 \times 10^9/L$) persisted. Iron deficiency and inflammation were ruled out. After 6 months, bone marrow cytogenetic analysis displayed a complete cytogenetic response (CCR), and

Table 1

Clinical and biological characteristics of reported $JAK2^{V617F}$ MPN discovered in previously or concomitantly diagnosed Ph+ CML (BCM indicates below costal margin; CMR, complete molecular response; echo, abdominal echogram; ET, essential thrombocytemia; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; PMF, primary myelofibrosis; MMR, major molecular response; Mo, months; MPN, myeloproliferative neoplasm; NA, not available; plt, platelets; PV, polycythemia vera; RARS-T, refractory anemia with ringed sideroblasts and marked thrombocytosis).

Authors	JAK2 MPN	Time interval from CML to JAK2 MPN (mo)	Hb (g/L) ^a	Plt ($\times 10^9/L$) ^a	Spleen size ^a	Karyotype ^a	JAK2 ^{V617F} mutated allele		BCR-ABL transcript ^b	Best molecular response to imatinib (mo)
							At CML diagnosis	At MPN diagnosis		
Patient #1 (present report)	PMF	12	Normal	784	2 cm (BCM)	46,XX,t(13;17)(q14;q22)[8]/46,XX,del(13q)[6]/46,XX[11]	0.5%	92%	0.98 ^b (12)	MMR (36)
Patient #2 (present report)	ET	6	Normal	716	Normal	Normal	0.2%	9%	0.50 ^b (6)	MMR (18)
Gattenlohner et al. [10]	RARS-T	5	109	620	NA	NA	5%	35%	Undetectable	CMR (5)
Conchon et al. [11]	PMF	0	100	689	Enlargement	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]	High levels	High levels	130% ^b (0)	3.7% (2)
Cambier et al. [12]	PV	0	246	380	NA	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[10]/45,X,-Y[3]/46,XY[8]	High levels	High levels	10% ^b (0)	CMR (9)
Inami et al. [13]	PV	>60	Ht > 50%	NA	NA	Normal	2%	2%	NA	NA
Hussein et al. [14]	PMF	23	138	NA	Normal	Normal	5%	23%	Undetectable	CMR (11)
Krämer et al. [15]	PMF	60	NA	NA	18 cm (echo)	Normal	35%	45%	Undetectable	CMR (16)

^a At MPN diagnosis.

^b BCR-ABL/ABL ratio.

blood quantitative RT-PCR analysis showed a molecular response, with $BCR-ABL/ABL$ ratio dropping from 94% at diagnosis to 0.4%. Because of the persistent isolated thrombocytosis ($716 \times 10^9/L$), an AS-qPCR analysis of blood neutrophils was performed and revealed a $JAK2^{V617F}$ mutation ($JAK2^{V617F}/total\ JAK2$ ratio = 9%). The diagnosis being consistent with a coexisting $JAK2^{V617F}$ positive MPN and Ph+ CML, imatinib was pursued and a low dose of salicylic acid was added. After 18 months, despite a MMR ($BCR-ABL/ABL$ ratio = 0.03%), platelet count was still high ($714 \times 10^9/L$) but neither thrombosis nor hemorrhagic event had occurred. Spleen enlargement persisted (16.4 cm using abdominal echogram).

3. Discussion

Cases of $JAK2^{V617F}$ MPN discovered in previously or concomitantly diagnosed Ph+ CML are uncommon (Table 1). In patient #1 from our report, as in three out of six reported observations [11,14,15], clinical presentation of $JAK2^{V617F}$ MPN was consistent with a PMF. We detected in this case a 13q deletion, one of the most frequent recurrent chromosomal abnormalities described in PMF. The patient #2 reported here is the first case of $JAK2$ mutated ET among these rare patients described in the literature.

In both our cases, a very low level of $JAK2^{V617F}$ mutation was detected in blood at the time of CML diagnosis, such a level being at the limit of sensitivity of AS-qPCR (0.5%) [16]. This finding is in contrast with three reports showing high levels of the mutated allele at the time of CML diagnosis [11,12,15]. As in cases described by Gattenlohner et al. [10] and Hussein et al. [14], we observed under imatinib therapy an increase in $JAK2^{V617F}$ mutation level while a reduction of $BCR-ABL$ mRNA was obtained. Subsequently, the $JAK2^{V617F}$ MPN had been diagnosed when a sustained thrombocytosis and a persistent spleen enlargement were observed under effective imatinib therapy.

It is interesting to note that both our patients responded very well to imatinib. They both rapidly achieved a complete cytogenetic response followed by a major molecular response. In the literature, four cases out of six showed a major molecular response, which could seem more frequent than one could expect [10,12,14,15]. Hence, imatinib treatment might be very efficient in these rare patients.

The two cases described here further demonstrate that a $BCR-ABL$ fusion gene and a $JAK2^{V617F}$ mutation can coexist in the same patient. In our report, the increase in $JAK2^{V617F}$ mutation burden during Ph+ clone suppression by imatinib therapy favors the hypothesis of 2 independently growing aberrant stem cell clones, suggesting that $JAK2^{V617F}$ MPN is not a consequence of progressive CML, but an underlying disease emerging from separate cells. Owing to a proliferative advantage, the $BCR-ABL$ positive hematopoiesis could overwhelm the $JAK2$ mutated hematopoiesis. Then, imatinib therapy suppresses the $BCR-ABL$ clone, enabling the proliferation of $JAK2^{V617F}$ mutated cells. Several findings suggest that in a certain proportion of patients with MPN, a mutation in a still unknown gene would precede the acquisition of $JAK2^{V617F}$ mutation [3,17]. This initial genetic background might enhance genomic instability leading not only to $JAK2$ mutations, but also to $BCR-ABL$ and other rearrangements in rare cases.

4. Conclusion

Physicians have to keep in mind that persistent or increasing thrombocytosis during effective treatment of Ph+ CML may be caused by an underlying Ph- MPN. Further studies on such cases should bring more insights in the pathophysiology of these disorders.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

Contributions. LV and AT interpreted the data and drafted the manuscript; CPR, contributed to the interpretation of results and critically reviewed the manuscript; APL, JF, CC, CG, LG, MGB, JOB contributed to revising the article; OT analyzed the data and wrote the final manuscript version.

References

- [1] James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature* 2005;434:1144–8.
- [2] Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054–61.
- [3] Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779–90.
- [4] Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Pichal JT, Verstovsek S, et al. JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* 2005;106:3370–3.
- [5] Krämer A. JAK2-V617F and BCR-ABL—double jeopardy? *Leukemia Res* 2008;32:1489–90.
- [6] Bornhäuser M, Mohr B, Oelschlaegel U, Bornhäuser P, Jacki S, Ehninger G, et al. Concurrent JAK2(V617F) mutation and BCR-ABL translocation within committed myeloid progenitors in myelofibrosis. *Leukemia Res* 2008;6:993–5.
- [7] Bocchia M, Vannucchi AM, Gozzetti A, Guglielmelli P, Poli G, Crupi R, et al. Insights into JAK2-V617F mutation in CML. *Lancet Oncol* 2007;8:864–6.
- [8] Jallades L, Hayette S, Tigaud I, Johnston A, Coiffier B, Magaud JP, et al. Emergence of therapy-unrelated CML on a background of BCR-ABL-negative JAK2^{V617F}-positive chronic idiopathic myelofibrosis. *Leukemia Res* 2008;32:1608–10.
- [9] Mirza I, Frantz C, Clarke G, Voth AJ, Turner R. Transformation of polycythemia vera to chronic myelogenous leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:1719–24.
- [10] Gattenlöhner S, Völker HU, Etschmann B, Einsele H, Müller-Hermelink HK. BCR-ABL positive chronic myeloid leukemia with concurrent JAK2(V617F) positive myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm (RARS-T). *Am J Hematol* 2008 [Epub ahead of print].
- [11] Conchon MR, Costa JL, Novaes MM, Dorliac-Llacer PE, de Alencar Fischer Chamone D, Bendit I. Simultaneous detection of JAK2 V617F mutation and Bcr-Abl translocation in a patient with chronic myelogenous leukemia. *Int J Hematol* 2008;88:243–5.
- [12] Cambier A, Renneville A, Cazaentre T, Soenen V, Cossement C, Giraudier S, et al. JAK2^{V617F}-positive polycythemia vera and Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia: one patient with two distinct myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2008;22:1454–5.
- [13] Inami M, Inokuchi K, Okabe M, Kosaka F, Mitamura Y, Yamaguchi H, et al. Polycythemia associated with the JAK2^{V617F} mutation emerged during treatment of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 2007;21:1103–4.
- [14] Hussein K, Bock O, Seegers A, Flasshove M, Henneke F, Buesche G, et al. Myelofibrosis evolving during imatinib treatment of a chronic myeloproliferative disease with coexisting BCR-ABL translocation and JAK2^{V617F} mutation. *Blood* 2007;109:4106–7.
- [15] Krämer A, Reiter A, Kruth J, Erben P, Hochhaus A, Müller M, et al. JAK2-V617F mutation in a patient with Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Lancet Oncol* 2007;8:658–60.
- [16] Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, et al. The JAK2^{V617F} mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2006;108:1865–7.
- [17] Kralovics R, Teo SS, Li S, Theodorides A, Buser AS, Tichelli A, et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;108:1377–80.

L. Véronèse*

A. Tchirkov

Univ Clermont 1, Fac Médecine, Histologie
Embryologie Cytogénétique, Clermont-Ferrand,
F-63001; CHU Clermont-Ferrand, Cytogénétique
Médicale, Clermont-Ferrand, F-63003, France

C. Richard-Pebrel

CHU Clermont-Ferrand, Laboratoire
d'Immuno-Hématologie, Hôtel-Dieu,
Clermont-Ferrand, F-63003, France

A. Ledoux-Pilon

CHU Clermont-Ferrand, Anatomie Pathologique,
Hôtel-Dieu, Clermont-Ferrand, F-63003, France

J. Fleury

Pôle Santé République, Oncologie Médicale,
Clermont-Ferrand, France

C. Chaletex

CHU Clermont-Ferrand, Hématologie Clinique Adulte
et Thérapie Cellulaire, Hôtel-Dieu, Clermont-Ferrand,
F-63003, France

C. Goumy

L. Gouas

Univ Clermont 1, Fac Médecine, Histologie
Embryologie Cytogénétique, Clermont-Ferrand,
F-63001; CHU Clermont-Ferrand, Cytogénétique
Médicale, Clermont-Ferrand, F-63003, France

M.G. Berger

CHU Clermont-Ferrand, Laboratoire
d'Immuno-Hématologie, Hôtel-Dieu,
Clermont-Ferrand, F-63003, France

P. Vago

Univ Clermont 1, Fac Médecine, Histologie
Embryologie Cytogénétique, Clermont-Ferrand,
F-63001; CHU Clermont-Ferrand, Cytogénétique
Médicale, Clermont-Ferrand, F-63003, France

J.O. Bay

O. Tournilhac

CHU Clermont-Ferrand, Hématologie Clinique Adulte
et Thérapie Cellulaire, Hôtel-Dieu, Clermont-Ferrand,
F-63003, France

* Corresponding author at: Cytogénétique
Médicale, Faculté de Médecine / CHU
Clermont-Ferrand, BP 38 F-63001, France.
Tel.: +33 4 73 17 81 00; fax: +33 4 73 26 91 82.
E-mail address: lveronese@chu-clermontferrand.fr
(L. Véronèse)

10 July 2009

Available online 14 October 2009

ARTICLE 8

A TCHIRKOV, V SAPIN, G MARCEAU, E CHAUTARD, G NARLA, **L VERONESE**, P VAGO, S FRIEDMAN, T KHALIL, JL KEMENY AND P VERRELLE. **Increased expression of the oncogenic KLF6-SV1 transcripts in human glioblastoma.** *Clin Chem Lab Med.* 2010; 1167-70

Introduction : Les tumeurs du système nerveux central (SNC) de l'adulte sont majoritairement représentées par les gliomes, dont les glioblastomes (GBM) constituent la forme la plus agressive. Afin de distinguer les GBM des autres gliomes, il est crucial de disposer de marqueurs biologiques permettant de préciser le diagnostic et le pronostic de la tumeur. Le gène *KLF6* (Krüppel-like factor 6) est un gène candidat prometteur pour une telle approche. Le but de notre étude était de rechercher une corrélation entre l'expression des différents variants d'épissage de *KLF6* et le grade du gliome. Nous avons quantifié le niveau de l'ARNm de *KLF6* total, *KLF6* WT et *KLF6* SV1 (variant d'épissage) par RT-PCR quantitative en temps réel dans une série de 55 échantillons tumoraux.

Résultats : Par rapport aux autres gliomes, le groupe GBM présentait une augmentation du niveau moyen d'expression de *KLF6* total (2,2 fois plus élevé) associée à une augmentation du ratio d'épissage de *KLF6* (2,1 fois plus élevé). De plus, le niveau d'expression de *KLF6-SV1* était 2,2 fois plus élevé dans le groupe GBM, suggérant que l'augmentation du ratio d'épissage était lié à l'augmentation d'expression du variant oncogénique *KLF6-SV1*.

Conclusion : Ce travail démontre que la quantification des formes totales et épissées de *KLF6* peut constituer un nouvel outil moléculaire pour la détermination du grade des gliomes.

Increased expression of the oncogenic *KLF6*-SV1 transcript in human glioblastoma

Andrei Tchirkov^{1–3,a}, Vincent Sapin^{4,a,*}, Geoffroy Marceau⁴, Emmanuel Chautard^{1,3}, Goutham Narla⁵, Lauren Veronese², Scott Friedman⁶, Toufic Khalil⁷, Philippe Vago², Jean-Louis Kemeny⁸ and Pierre Verrelle^{1,3}

¹ University Clermont 1, EA 3846, School of Medicine, Clermont-Ferrand, France

² CHU Clermont-Ferrand, Cytogénétique Médicale, Clermont-Ferrand, France

³ Laboratoire de Radio-Oncologie, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France

⁴ GREd, CNRS UMR6247, Clermont Universités, INSERM U931, School of Medicine, Clermont-Ferrand, France

⁵ Departments of Genetics and Genomic Sciences/Medicine, The Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA

⁶ Division of Liver Diseases, The Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA

⁷ CHU Clermont-Ferrand, Neurochirurgie A, Clermont-Ferrand, France

⁸ CHU Clermont-Ferrand, Anatomo-Pathologie, Clermont-Ferrand, France

Abstract

Background: Gliomas constitute the vast majority of primary central nervous system tumors in adults. Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive form of these primary brain tumors. There is a need to define diagnostic and prognostic markers that may help to distinguish GBM from non-GBM tumors. The Krüppel-like factor 6 (*KLF6*) gene has recently emerged as a promising candidate. The goal of our study was to determine if there is a link between *KLF6* splice variants expression and different grades of gliomas.

Methods: Fifty-three primary gliomas tumor samples were analyzed using quantitative real-time PCR for the total *KLF6*, wild-type and alternatively spliced (SV1) *KLF6* mRNA.

Results: Compared to the non-GBM group, the GBM group had a 2.2-fold increase in the mean level of total *KLF6* mRNA expression. GBM showed a 2.1-fold increase in the *KLF6* splicing ratio. In addition, *KLF6*-SV1 mRNA expres-

sion levels were also 2.2-fold higher in the GBM group, suggesting that the increase in the *KLF6* splicing ratio was due to increased expression of the *KLF6*-SV1 oncogenic splice variant.

Conclusions: Our study demonstrates that quantification of total and spliced forms of *KLF6* may provide a new and useful supplementary molecular tool for grading glioma. Clin Chem Lab Med 2010;48:1167–70.

Keywords: gliomas; glioblastoma multiforme; *KLF6*-SV1; Krüppel-like factor (*KLF*)6.

Introduction

Gliomas constitute the vast majority of primary tumors of the central nervous system (CNS). They form a complex group of tumors because of the great variability in their clinical behavior and malignant potential. Of the primary CNS tumors, glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive form (1). The World Health Organization (WHO) grading system is used to predict the outcome of glioma patients which is strikingly worse in GBM (grade IV) compared with the three other grades (I–III) (2). Despite modest improvements in diagnosis and therapy for GBM, the survival rates remain very poor, with 18% survival at 1 year and 3% at 2 years (3). Thus, there is a critical need to define the molecular pathways underlying the differences in the evolution and behavior of GBM and non-GBM tumors.

A member of the Krüppel-like factor (*KLF*) family of zing fingers transcription factors (4), *KLF6* (also called Zf9 or COPEB) (5, 6) is an interesting potential candidate to elucidate these differences. *KLF6* is a tumor suppressor gene that was shown to be deregulated and/or inactivated in GBM, as well as other cancers including prostate, colorectal, hepatocellular and nasopharyngeal carcinomas (7–10). As with other cancers, *KLF6* gene function in GBM might be abrogated owing to increased alternative splicing that yields, in particular, a dominant-negative isoform, *KLF6* splice variant 1 (SV1) that antagonizes wild-type *KLF6*-mediated growth suppression (11). Targeted reduction of this splice variant using RNA interference (RNAi) was found to decrease cell proliferation in GBM cell lines (11).

Higher expression of the *KLF6*-SV1 isoform is known to be associated with increased tumor grade and stage in various cancers, such as prostate, pancreas and lung adenocarcinoma (12–14). To date, the relationship between the degree of *KLF6*-SV1 expression and tumor grade has not been explored in tissue collections. Therefore, the goal of our

^aA. Tchirkov and V. Sapin contributed equally to this work.

*Corresponding author: Prof. Vincent Sapin, Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine, 28, Place Henri Dunant, BP. 38, 63000 Clermont-Ferrand, France
Phone: +33 4 73 17 81 74, Fax: +33 4 73 27 61 32,
E-mail: vincent.sapin@u-clermont1.fr

Received October 28, 2009; accepted February 15, 2010;
previously published online June 15, 2010

study was to investigate whether progressive changes in *KLF6* alternative splicing correlate with glioma grading.

Materials and methods

Setting

The study was conducted at the University Hospital of Clermont-Ferrand, France. The procedures used in this study were in accordance with the current revision of the Helsinki Declaration.

Patients and samples

Primary tumor samples were obtained from 53 glioma patients during surgical resection of their lesion. The samples used to determine *KLF6* and *KLF6-SV1* expression were taken from the resected material during the course of a standard diagnostic procedure. Immediately after surgery, the samples were snap-frozen and stored in liquid nitrogen until extraction of RNA.

Histological diagnosis and grading of gliomas were based on WHO criteria (2). Nineteen patients (11 males, 8 females) had non-GBM forms including 10 low-grade gliomas (WHO grade II) and nine anaplastic gliomas (WHO grade III). The grade II tumors included four astrocytomas, three oligodendrogliomas and three mixed oligoastrocytomas. The grade III tumors included one anaplastic astrocytoma, two anaplastic oligodendrogliomas and six anaplastic oligoastrocytomas. The remaining 34 cases (19 males, 15 females) were classified as GBMs (WHO grade IV). The mean age at diagnosis was 32.0 ± 2.3 years for non-GBM patients, and 58.7 ± 1.7 years for patients with GBM (Table 1). Patients with GBM and anaplastic gliomas were managed by surgery, followed with either high dose carmustine and then radiotherapy in cases with optimal tumor resection ($n=22$), or radiotherapy and concomitant temozolomide followed by monthly cycles of adjuvant temozolomide in cases of a partial tumor resection or biopsy alone ($n=21$). Patients with low grade gliomas were treated by surgery alone, with radiation deferred for progressive disease. Median follow-up was 34 months (range, 6–130 months).

Extraction of RNA and preparation of cDNA

Total mRNA was extracted from tumor samples using RNA Plus® reagent (QBiogen, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions. RNA from each sample (10 µg) was reverse transcribed using SuperScript II® (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) as described previously (15). As control, a reverse transcription reaction was performed without enzyme, and the sample was then processed as a negative control to exclude possible DNA contamination.

Quantitative real-time PCR for total *KLF6*, wild-type *KLF6*, and *KLF6-SV1*

Real-time PCR reactions were performed with the DNA Master SYBRGreen I® reagent in the Light Cycler® system (Roche Diagnostics, Meylan, France). The primers used for quantitative real-time PCR were optimized to amplify either total *KLF6*/*KLF6* (detection of both wt*KLF6* and all *KLF6* spliced forms), *KLF6* wild type alone (wt*KLF6*), or the oncogenic splice variant *KLF6-SV1* specifically (Figure 1) (16). Overall expression of *KLF6* spliced forms was evaluated by calculating the difference in amounts of t*KLF6* and wt*KLF6* transcripts, and by obtaining a *KLF6* splicing ratio: (t*KLF6*–wt*KLF6*)/t*KLF6*. Quantification of *ABL* transcripts as an internal control for the amount and quality of cDNA was performed for all samples (15). Several studies have confirmed that the *ABL* gene is an appropriate reference for quantitative real-time PCR studies of both pathological and normal cells and tissues (17). The results are presented as the ratio between the different *KLF6* and *ABL* transcripts. Glioma samples were analyzed in blinded fashion. All experiments were performed in triplicate with high consistency and reproducibility of the results. The primer sequences (18) used for the analysis were as follows (see Figure 1 for localization on different exons):

t*KLF6* forward 5'-GGCAACAGACCTGCCTAGAG-3' and reverse 5'-AGGAT TCGCTGCTGACATCT-3'
wt*KLF6* forward 5'-CACAGGAGAAAAGCCTTACA-3' and reverse 5'-GTCACA GTGGGAGCATTTA-3'
KLF6-SV1 forward 5'-CCTCGCCAGGGAAGGAGAA-3' and reverse 5'-TCCAC AGATCTTCCTGGCTGTC-3'
ABL forward 5'-GCCGCTCGTTGGAAGTCCAAGG-3' and reverse 5'-TGACTGG CGTGATGTAGTTTGCTT-3'

Statistical analysis

The χ^2 and Kruskal-Wallis tests were used to compare quantitative parameters. Overall patient survival was calculated using the Kaplan-Meier method. Statistical analyses were performed using SEM software (19).

Results

We first analyzed the expression levels of the t*KLF6* mRNA (wild-type and spliced) forms by real-time PCR, as shown in Table 1. Compared to the non-GBM group, the GBM group had a 2.2-fold increase in t*KLF6* mRNA expression

Table 1 Patient characteristics and *KLF6* mRNA expression levels in non-glioblastoma multiforme (non-GBM) and glioblastoma multiforme (GBM) groups.

	Non-GBM patients (n = 19)	GBM patients (n = 34)	p-Value
t <i>KLF6</i> mRNA levels	39.8 ± 12.0 (range: 3–238)	88.9 ± 22.3 (range: 7–637)	0.04
wt <i>KLF6</i> mRNA levels	37.8 ± 11.0 (range: 3–181)	53.6 ± 17.7 (range: 5–542)	0.55
<i>KLF6</i> splicing ratio	0.21 ± 0.05	0.44 ± 0.03	0.0012
SV1- <i>KLF6</i> mRNA levels	13.0 ± 3.6 (range: 0–62)	28.1 ± 3.9 (range: 0–97)	0.0061

Mean (\pm standard error of the mean) are shown. Difference between groups is considered significant when $p < 0.05$. GBM, glioblastoma multiforme; t*KLF6*, total *KLF6*; wt*KLF6*, wild-type *KLF6*.

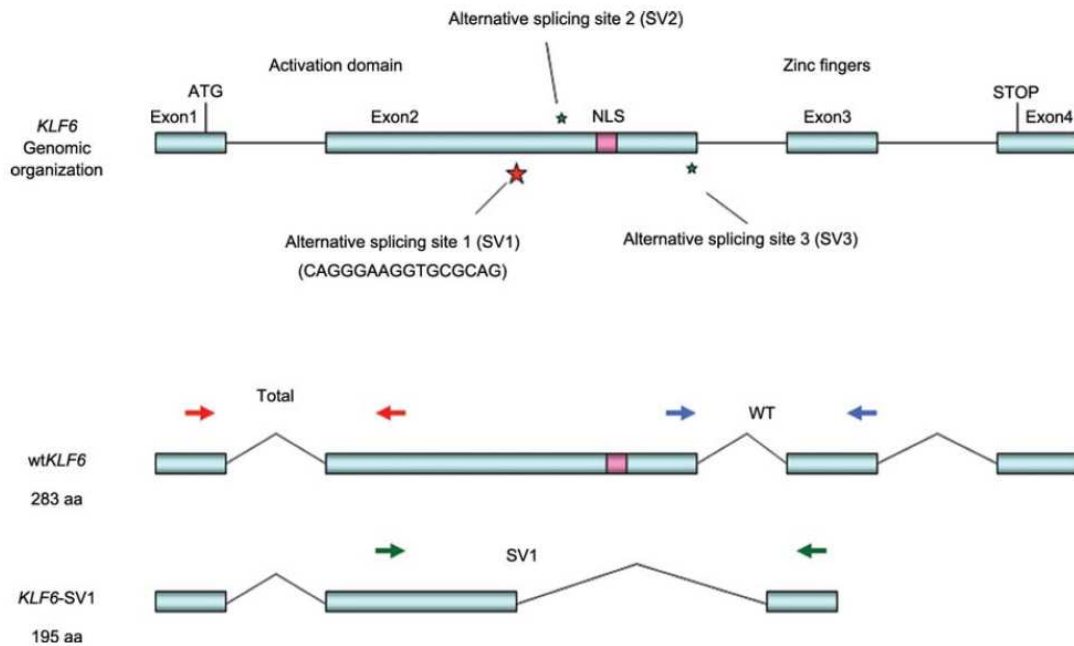


Figure 1 *KLF6* genomic organization [adapted from (14)].

The *KLF6* genomic organization is schematically represented in the upper part of the Figure. The three alternative splicing sites are illustrated and the sequence of the major splicing site SV1 is detailed. Start and stop codons, protein domains and nuclear localization signal (NLS) are indicated. Both structures of *KLF6* wild-type (wt*KLF6*) and spliced form *KLF6*-SV1 are shown in the lower part of the Figure with the protein length expressed in terms of amino acids (aa). The primers used to amplify total *KLF6* or *KLF6*-SV1 or wt*KLF6* are shown in the Figure.

($p=0.04$). To determine the source of this difference, we measured wt*KLF6* mRNA concentrations, which were found to be similar between the two groups ($p=0.55$). We next addressed the possibility that this difference resulted from increased *KLF6* splice forms in the two groups. We identified a 2.1-fold increase in the *KLF6* splicing ratio between GBM and non-GBM groups ($p=0.0012$). In order to determine if increased *KLF6*-SV1 expression was responsible for this difference, we specifically quantified its expression in all patient samples, which demonstrated a 2.2-fold higher expression of this splice variant in the GBM group ($p=0.0061$). The expression of *KLF6*-SV2 and *KLF6*-SV3 were not analyzed because several previously published studies failed to demonstrate significant changes in *KLF6*-SV2 and *KLF6*-SV3 expression in GBM and patients with prostate cancer (11, 14).

During the follow-up period, 29 of 34 GBM patients died, and the mean survival time for this group was 16 months. Only one death occurred among 19 patients with non-GBM gliomas. The median survival time could not be calculated for this group, but the 100% 3-year survival rate was consistent with a much better prognosis for non-GBM patients. In the GBM group, there was a trend for decreased survival for GBM patients, with higher levels of *KLF6*-SV1 expression. The proportion of patients who were alive at 1 year was 62.5% for patients with low (less than median) *KLF6*-SV1, and 42.1% for patients with high *KLF6*-SV1, but this difference was not significant (χ^2 -test, $p=0.22$).

Discussion

In the current study, we have shown that alternative splicing of the tumor suppressor gene *KLF6* may have a role in progression of glioma. This is the first report showing that the expression of the oncogenic transcript *KLF6*-SV1 in patients with glioma is significantly increased in GBM as compared to non-GBM tumors. This result further reinforces the potential role of this transcription factor and its splice variant *KLF6*-SV1 in oncogenesis and progression of glioma (7, 8, 11).

Recent evidence suggests an important role for alternative splicing in the progression of human cancer (20, 21). In particular, increased expression of *KLF6*-SV1 was associated with disease progression and poor outcome in patients with prostate (14), ovarian (18) and pancreatic cancer (13) and in those with adenocarcinoma of the lung (12). The *KLF6*-SV1 isoform functionally antagonizes the ability of wt*KLF6* to suppress cell proliferation and tumorigenicity in a dominant-negative manner. It does this by antagonizing the ability of wild-type *KLF6* to up-regulate p21 expression or down-regulate cyclin D1 expression (cell cycle arrest), increases apoptosis using ATF3, DAPK or NOXA pathways, and decreases tumoral (VEGF-mediated) angiogenesis or (E-cadherin-mediated) invasion (22). As previously proposed (14), evolution of glioma appears to be strongly linked to the ratio of wild-type and *KLF6* splice forms, highlighting the potential

utility and interest in measuring this ratio as an aid in the molecular diagnosis of gliomas. In contrast to the finding in lung adenocarcinoma (12) and pancreatic cancer (13), no significant link between increased *KLF6*-SV1 expression levels and survival could be found in GBM; likely due to the very low survival rate of patients with GBM.

Our findings of *KLF6*-SV1 overexpression in GBM need to be confirmed in a larger series of patients. These results could open new therapeutic options for GBM based on targeted reduction in *KLF6*-SV1, as has been suggested in models of lung and ovarian carcinoma.

Acknowledgements

We thank ATT[®] (Auvergne Traduction Technique) for proofreading the manuscript.

Conflict of interest statement

Authors' conflict of interest disclosure: The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Research funding: None declared.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

References

- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005;55:10–30.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97–109.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004;64:6892–9.
- Kaczynski J, Cook T, Urrutia R. Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol* 2003;4:206.
- Chiambaretta F, Nakamura H, De Graeve F, Sakai H, Marceau G, Maruyama Y, et al. Kruppel-like factor 6 (KLF6) affects the promoter activity of the alpha1-proteinase inhibitor gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:582–90.
- Slavin D, Sapin V, Lopez-Diaz F, Jacquemin P, Koritschoner N, Dastugue B, et al. The Kruppel-like core promoter binding protein gene is primarily expressed in placenta during mouse development. *Biol Reprod* 1999;61:1586–91.
- Jeng YM, Hsu HC. KLF6, a putative tumor suppressor gene, is mutated in astrocytic gliomas. *Int J Cancer* 2003;105:625–9.
- Kimmelman AC, Qiao RF, Narla G, Banno A, Lau N, Bos PD, et al. Suppression of glioblastoma tumorigenicity by the Kruppel-like transcription factor KLF6. *Oncogene* 2004;23:5077–83.
- Kohler B, Wolter M, Blaschke B, Reifenberger G. Absence of mutations in the putative tumor suppressor gene KLF6 in glioblastomas and meningiomas. *Int J Cancer* 2004;111:644–5.
- Montanini L, Bissola L, Finocchiaro G. KLF6 is not the major target of chromosome 10p losses in glioblastomas. *Int J Cancer* 2004;111:640–1.
- Camacho-Vanegas O, Narla G, Teixeira MS, DiFeo A, Misra A, Singh G, et al. Functional inactivation of the KLF6 tumor suppressor gene by loss of heterozygosity and increased alternative splicing in glioblastoma. *Int J Cancer* 2007;121:1390–5.
- DiFeo A, Feld L, Rodriguez E, Wang C, Beer DG, Martignetti JA, et al. A functional role for KLF6-SV1 in lung adenocarcinoma prognosis and chemotherapy response. *Cancer Res* 2008;68:965–70.
- Hartel M, Narla G, Wente MN, Giese NA, Martignoni ME, Martignetti JA, et al. Increased alternative splicing of the KLF6 tumour suppressor gene correlates with prognosis and tumour grade in patients with pancreatic cancer. *Eur J Cancer* 2008;44:1895–903.
- Narla G, DiFeo A, Yao S, Banno A, Hod E, Reeves HL, et al. Targeted inhibition of the KLF6 splice variant, KLF6 SV1, suppresses prostate cancer cell growth and spread. *Cancer Res* 2005;65:5761–8.
- Tchirkov A, Rolhion C, Kemeny JL, Irthum B, Puget S, Khalil T, et al. Clinical implications of quantitative real-time RT-PCR analysis of hTERT gene expression in human gliomas. *Br J Cancer* 2003;88:516–20.
- Narla G, DiFeo A, Fernandez Y, Dhanasekaran S, Huang F, Sangodkar J, et al. KLF6-SV1 overexpression accelerates human and mouse prostate cancer progression and metastasis. *J Clin Invest* 2008;118:2711–21.
- Buonamici S, Ottaviani E, Testoni N, Montefusco V, Visani G, Bonifazi F, et al. Real-time quantitation of minimal residual disease in inv(16)-positive acute myeloid leukemia may indicate risk for clinical relapse and may identify patients in a curable state. *Blood* 2002;99:443–9.
- DiFeo A, Narla G, Hirshfeld J, Camacho-Vanegas O, Narla J, Rose SL, et al. Roles of KLF6 and KLF6-SV1 in ovarian cancer progression and intraperitoneal dissemination. *Clin Cancer Res* 2006;12:3730–9.
- Kwiatkowski F, Girard M, Hacene K, Berlie J. [Sem: a suitable statistical software adapted for research in oncology]. *Bull Cancer* 2000;87:715–21.
- Fackenthal JD, Godley LA. Aberrant RNA splicing and its functional consequences in cancer cell. *Dis Model Mech* 2009;1:37–42.
- Pajares MJ, Ezponda T, Catena R, Calvo A, Pio R, Montuenga LM. Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol* 2007;8:349–57.
- DiFeo A, Martignetti JA, Narla G. The role of KLF6 and its splice variants in cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2009;12:1–7.

ARTICLE 9

RAVINET A, GAY BELILLE M, LEMAL R, VERONESE L, BAY JO, PRIE N. [Physiopathological, diagnostic and therapeutic impacts of chromosomal translocations in hematological malignancies]. *Bull Cancer* 2011 Dec;98(12):1403-18

Revue de la littérature

L'oncogenèse est liée à la survenue de multiples évènements génomiques permettant aux cellules cancéreuses d'acquérir de nouvelles propriétés, notamment des capacités de survie et de prolifération, en dehors de tous signaux de contrôle. Parmi ces évènements génomiques, l'étude des translocations récurrentes, particulièrement fréquentes en onco-hématologie, a permis une meilleure compréhension des mécanismes de leucémogenèse et de lymphomagenèse. On distingue classiquement ces translocations selon leur conséquence physiopathologique. Il peut s'agir de la production d'un gène de fusion codant pour une protéine chimérique présentant une activité nouvelle ou aberrante ; cette anomalie aboutit le plus souvent à l'activation constitutive d'un proto-oncogène. Dans d'autres cas, la translocation peut entraîner l'expression anormale d'un proto-oncogène de structure normale par dérégulation transcriptionnelle. La mise en évidence de translocations récurrentes et la compréhension des conséquences physiopathologiques de ces remaniements chromosomiques s'accompagnent d'un réel impact sur la prise en charge quotidienne du patient en hématologie. En effet, ces anomalies cytogénétiques constituent dans certains cas des outils diagnostiques. Elles participent dans d'autre cas à l'évaluation du pronostic et à l'adaptation de la stratégie thérapeutique. Elles ont parfois permis le développement de thérapies ciblées s'accompagnant d'une amélioration de la survie des patients. Enfin, les aberrations cytogénétiques et leurs conséquences moléculaires peuvent être utilisées comme marqueurs de réponse et de suivi de la maladie résiduelle.

Translocations récurrentes en onco-hématologie : physiopathologie, intérêt clinique et thérapeutique

Physiopathological, diagnostic and therapeutic impacts of chromosomal translocations in hematological malignancies

Aurélien Ravinet¹, Mathilde Gay Belille², Richard Lemal¹, Lauren Veronese², Jacques-Olivier Bay¹, Nolwen Prie²

Article reçu le 22 septembre 2011,

accepté le 14 novembre 2011

Tirés à part : A. Ravinet

¹ Université d'Auvergne, CHU de Clermont-Ferrand, hôpital Estaing, service de thérapie cellulaire et d'hématologie clinique adulte, Inserm CIC-501, EA 3846, 1, place Lucie-Aubrac, 63003 Clermont-Ferrand Cedex 01, France

<aravinet@chu-clermontferrand.fr>

² CHU de Clermont-Ferrand, hôpital Estaing, service de cytogénétique médicale, 1, place Lucie-Aubrac, 63003 Clermont-Ferrand Cedex 01, France

Pour citer cet article : Ravinet A, Gay Belille M, Lemal R, Veronese L, Bay JO, Prie N. Translocations récurrentes en onco-hématologie : physiopathologie, intérêt clinique et thérapeutique. *Bull Cancer* 2011 ; 98 : 1403-1418.
doi : 10.1684/bdc.2011.1509.

Résumé. L'oncogenèse est liée à la survenue de multiples événements génomiques permettant aux cellules cancéreuses d'acquies de nouvelles propriétés, parmi lesquelles une capacité de survie et de prolifération, en dehors de tous signaux de contrôle. Parmi ces événements génomiques, l'étude des translocations récurrentes, particulièrement fréquentes en onco-hématologie, a permis une meilleure compréhension des mécanismes de leucémogénèse et de lymphomogénèse. On distingue classiquement ces translocations selon leur conséquence physiopathologique. Il peut s'agir de la production d'un gène de fusion codant pour une protéine chimérique, présentant une activité nouvelle ou aberrante correspondant le plus souvent à l'activation constitutive d'un proto-oncogène. Dans d'autres cas, la translocation peut entraîner l'expression anormale d'un proto-oncogène de structure normale par dérégulation transcriptionnelle. La mise en évidence de translocations récurrentes et la compréhension des conséquences physiopathologiques de ces remaniements chromosomiques s'accompagnent d'un réel impact sur la prise en charge quotidienne du patient en hématologie. Outre utilisées comme outils diagnostiques indispensables dans certaines hémopathies, ces anomalies cytogénétiques permettent l'évaluation du pronostic et l'adaptation de la stratégie thérapeutique. Elles ont, également, permis une amélioration de la survie par le développement de thérapies ciblées. Enfin, les aberrations cytogénétiques peuvent être utilisées comme marqueur de réponse et de suivi de la maladie résiduelle, grâce aux techniques de cytogénétique combinées aux techniques de biologie moléculaire. ▲

Mots clés : translocation, gène de fusion, activation transcriptionnelle, proto-oncogène, thérapie ciblée

Abstract. Oncogenesis is correlated with the occurrence of multiple genomic events allowing cancer cells to acquire new properties, including the capacity of survival and proliferation with down regulated control signals. Among those genomic events, the study of recurrent translocations, particularly common in oncohematology, has allowed for a better understanding of leucemogenesis and lymphomagenesis mechanisms. These translocations are classically distinguished depending on their physiopathologic consequences. It may encode for a fusion gene leading to a chimeric protein, which exhibits a new activity or an aberrant one, corresponding in most cases to the constitutive activation of a proto-oncogene. In other cases, these translocations may cause abnormal expression of a proto-oncogene with a regular structure by a transcriptional deregulation. Beyond this highlighting recurrent translocations and understanding better the physiopathologic consequences of these chromosomal modifications has a real impact on patients. These cytogenetic anomalies represent an essential diagnostic tool for some hematologies; and pave the way for a better evaluation of the prognosis and thus, a better adaptation of the therapeutic strategy. They also contributed to improve survival with the development of targeted therapies. Finally, thanks to cytogenetic techniques combined to molecular biology techniques, cytogenetic aberrations can be used as a marker of response, which allowed a monitoring of residual disease. ▲

Key words : translocation, chimeric gene, transcriptional activation, proto-oncogene, targeted therapy

Introduction

La description de translocations récurrentes dans les hémopathies malignes découle de la découverte par Nowell et Hungerford en 1960 de la première anomalie cytogénétique acquise en pathologie humaine : le chromosome Philadelphie, un chromosome « minute » du groupe G observé de façon récurrente dans les cellules de patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) [1]. Avant cette date, des anomalies chromosomiques avaient été observées dans différentes tumeurs animales ou humaines, sans pour autant qu'il existe de corrélation directe entre l'anomalie chromosomique et la pathologie. Par la suite, Rowley a démontré, en 1973, que ce chromosome Philadelphie correspond au dérivé 22 d'une translocation (9;22)(q34;q11) équilibrée [2]. Dix ans plus tard, l'étude moléculaire des points de cassure de cette translocation a permis de mettre en évidence les gènes *ABL* en 9q34 et *BCR* en 22q11, ainsi que la formation d'un gène de fusion fonctionnel *BCR-ABL* porté par le chromosome Philadelphie et responsable de la leucémogénèse [3-5]. Ainsi, en l'espace de deux décennies, la découverte du chromosome Philadelphie et la compréhension du mécanisme moléculaire qui en découle a permis de démontrer pour la première fois que les cancers peuvent être provoqués chez l'homme par des anomalies génomiques

clonales et acquises dans des cellules somatiques. La recherche d'autres anomalies récurrentes liées à des types particuliers de prolifération maligne et l'étude des gènes présents aux points de cassure se sont alors développées [6, 7]. Nous n'aborderons ici que les translocations équilibrées ; les délétions, monosomies, gains et amplifications, anomalies également récurrentes en onco-hématologie ne seront pas traitées.

Il est maintenant admis de distinguer les translocations associées aux processus oncogénique selon leur conséquence physiopathologique, à savoir, soit la production d'un gène de fusion codant pour une protéine chimérique présentant une activité nouvelle ou aberrante, soit l'expression anormale d'un proto-oncogène de structure normale par dérégulation transcriptionnelle (figure 1) [8-10]. De la même façon, de telles anomalies chromosomiques existent dans les tumeurs solides. Cependant, pour des raisons techniques, notamment la difficulté à établir des cultures primaires, leur analyse s'est révélée plus complexe.

Nous détaillerons tout d'abord les principales translocations décrites en onco-hématologie et leurs conséquences physiopathologiques à l'origine de l'oncogénèse, puis nous nous intéresserons aux conséquences thérapeutiques qui en découlent.

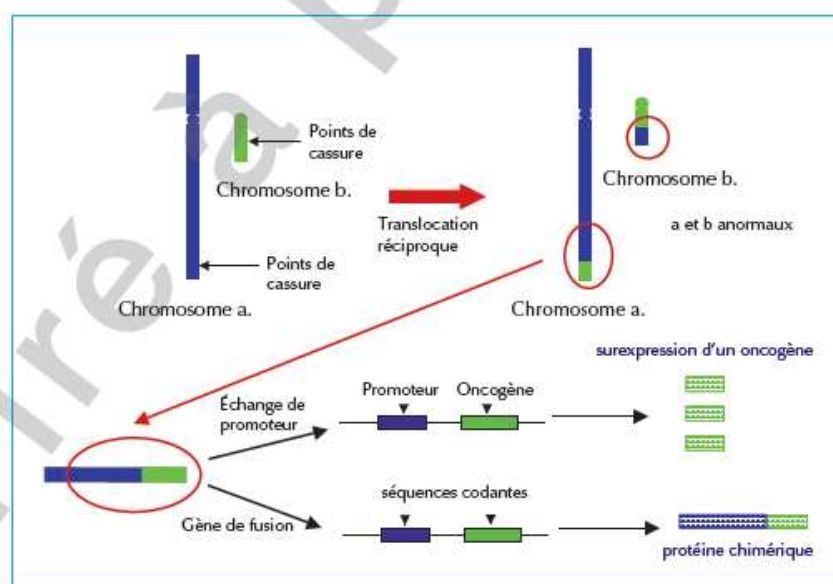


Figure 1. Les translocations et leurs conséquences physiopathologiques, formation d'un gène de fusion ou surexpression d'un oncogène.

Conséquences physiopathologiques des translocations

Translocation et gène de fusion

La formation d'un gène chimérique par fusion de segments de deux gènes distincts secondaire à un remaniement chromosomique (le plus souvent une translocation, mais parfois une délétion ou une inversion) est un phénomène causal classiquement observé dans les hémopathies myéloïdes, et plus rarement décrit dans les proliférations lymphoïdes. Les gènes participant à ces fusions appartiennent généralement aux familles de facteurs transcriptionnels ou de tyrosine-kinases qui assurent la transduction du signal. Dans certains cas, la protéine chimérique qui en résulte possède des propriétés particulières par rapport à la protéine normale : il peut s'agir d'une activation constitutive de cette protéine normale, ce qui correspond généralement à l'activation d'un proto-oncogène ou d'un effet dominant-négatif de la protéine chimérique sur la protéine normale. Dans d'autres cas, la protéine chimérique peut intervenir dans des phénomènes de régulation épigénétique de l'expression génique ou dans la régulation de l'apoptose (tableau 1).

Activation constitutive d'un proto-oncogène

Comme nous l'avons abordé en introduction, l'exemple le plus classique de ce type de remaniement correspond à la translocation (9;22)(q34;q11) ou ses formes variantes à trois ou quatre chromosomes, responsables de la formation du chromosome Philadelphie. Ce dernier porte la fusion de séquences du gène codant la sérine-thréonine-kinase, *BCR* (bande 22q11) avec des segments du gène codant la tyrosine-kinase, *ABL* (bande 9q34). Cette anomalie s'observe dans tous les cas de LMC, dans 20 % des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et dans de rares cas de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) (figure 2). La protéine chimérique résultante, *BCR-ABL*, contient le domaine catalytique d'*ABL* fusionné à un domaine de *BCR* provoquant une oligomérisation, et donc une activation constitutionnelle de la protéine chimérique en l'absence de signaux physiologiques d'activation. Cette activité tyrosine-kinase constitutive est responsable du recrutement et de la mise en jeu de voies de signalisation impliquées dans les processus de prolifération (voie RAS et JAK-STAT), d'apoptose (voies STAT et PI-3K), de différenciation et d'adhésion cellulaire [11].

La découverte du chromosome Philadelphie et la compréhension des phénomènes moléculaires ont conduit au développement d'inhibiteurs spécifiques de l'activité tyrosine-kinase de la protéine chimérique *BCR-ABL* ; l'efficacité de cette thérapie ciblée est maintenant bien établie dans la LMC.

La translocation (9;22)(q34;q11) n'est, cependant, pas constante dans les syndromes myéloprolifératifs. D'autres activations constitutives de tyrosine-kinase ont été décrites dans certains syndromes myéloprolifératifs Philadelphie-négatifs. C'est le cas du gène de fusion *ETV6-PDGFRβ* résultant de la translocation (5;12)(q33;p13), qui est classiquement retrouvée dans la leucémie myéomonocytaire chronique (LMMC). Par cette translocation, la région promotrice et les quatre premiers exons du gène *ETV6* (*TEL*) sont fusionnés à la portion 3' du gène *PDGFRβ* [12]. Physiologiquement, *ETV6* est un répresseur transcriptionnel avec un domaine d'oligomérisation appartenant à la famille des facteurs de transcription ETS ; *PDGFRβ* code pour une protéine à activité tyrosine-kinase possédant un domaine transmembranaire et un domaine catalytique. L'activation de *PDGFRβ* est normalement induite par la liaison de son ligand. La protéine de fusion *TEL-PDGFRβ* ne contient pas ce domaine de liaison au ligand, c'est le domaine d'oligomérisation de *TEL* conservé lors de la fusion qui est à l'origine de l'activation constitutive *in vitro* et *in vivo* de la tyrosine-kinase *PDGFRβ* [13].

Effet dominant-négatif

Les translocations peuvent dans certains cas provoquer la formation d'une protéine de fusion ayant une fonction dominante-négative sur une des protéines normales impliquées dans le réarrangement [6, 8].

Ce type de mécanisme a particulièrement été décrit dans les translocations réarrangeant les gènes codant pour le complexe *core-binding factor* (CBF). Ce complexe nucléaire hétérodimérique, constitué de deux sous-unités, *CBFα* et *CBFβ*, joue physiologiquement un rôle de facteur transcriptionnel. La sous-unité α possède un domaine de liaison spécifique à l'ADN. La sous-unité β interagit avec *CBFα* (par l'intermédiaire du domaine Runt de la sous-unité α) et augmente ainsi l'affinité de celle-ci pour l'ADN [14, 15].

L'un des trois gènes codant pour la sous-unité *CBFα* chez l'homme est le gène *RUNX1* (*Runt-related transcription factor 1*, anciennement nommé *AML1* (pour

Tableau 1. Principaux réarrangements chromosomiques responsables de la formation d'une protéine de fusion.

Formation d'une protéine de fusion ayant une nouvelle activité					
Mécanisme général	Anomalie chromosomique	Gènes impliqués	Gène de fusion	Protéine de fusion	Pathologie
Activité tyrosine-kinase	t(9;22)(q34;q11)	<i>ABL</i> : proto-oncogène à activité tyrosine-kinase, signalisation cellulaire (croissance et prolifération cellulaire) <i>BCR</i> : sérine-thréonine-kinase, domaine de dimérisation	<i>BCR-ABL</i>	Activation constitutive de l'activité tyrosine-kinase d' <i>ABL</i> par oligomérisation en l'absence de signaux physiologiques d'activation	LMC, LAL pro-B
	t(5;12)(q33;p13)	<i>ETV6</i> : répresseur transcriptionnel de la famille de facteurs de transcription ETS <i>PDGFRβ</i> : récepteur β à activité tyrosine-kinase de PDGF	<i>ETV6-PDGFRβ</i>	Activation constitutionnelle de l'activité tyrosine-kinase de <i>PDGFR</i>	LMC
Dominant négatif	t(8;21)(q22;q22)	<i>RUNX1</i> : possède un domaine de liaison à l'ADN et d'interaction avec <i>CBFβ</i> pour permettre l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes spécifiques des différentes lignées hématopoïétiques (GM-CSF, IL3, etc.) Contrôle de l'hématopoïèse <i>ETO</i> : appartient à un complexe de répression de la transcription	<i>RUNX1-ETO</i>	Inhibition de la régulation transcriptionnelle par le complexe CBF de gènes cibles impliqués dans la différenciation des cellules hématopoïétiques	LAM avec maturation, essentiellement LAM2
	t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6</i> : répresseur transcriptionnel de la famille de facteurs de transcription ETS <i>RUNX1</i> : possède un domaine de liaison à l'ADN et d'interaction avec <i>CBFβ</i> pour former un complexe CBF permettant l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes spécifiques des différentes lignées hématopoïétiques (GM-CSF, IL3, etc.)	<i>ETV6-RUNX1</i>	Répression de l'activité de transcription physiologique de <i>RUNX1</i>	LAL pro-B (enfant, adulte < 25 ans)
	t(15;17)(q22;q21)	<i>PML</i> : protéine nucléaire, « suppresseur de tumeur » <i>RARα</i> : récepteur à l'acide rétinoïque ; intervient dans la différenciation granulocytaire	<i>PML-RARα</i>	Blocage de l'activité transcriptionnelle de <i>RARα</i> entraînant un blocage de différenciation Inhibition d'une voie suppressive de tumeur	LAM3

Tableau 1. (Suite)

Formation d'une protéine de fusion ayant une nouvelle activité					
Mécanisme général	Anomalie chromosomique	Gènes impliqués	Gène de fusion	Protéine de fusion	Pathologie
	t(16;16)(p13;q22) inv(16)(p13;q22)	<i>MYH11</i> : permet la formation de filaments qui interfèrent avec la fonction de <i>CBFβ</i> <i>CBFβ</i> : interagit avec <i>RUNX1</i> (<i>CBFα</i>) pour augmenter l'affinité de <i>RUNX1</i> à l'ADN et former un complexe CBF, activateur transcriptionnel de gènes intervenant dans le contrôle de l'hématopoïèse (GM-CSF, IL3, etc.)	<i>CBFβ-MYH11</i>	Répression de l'activité de transcription physiologique de <i>RUNX1</i> (<i>CBFα</i>)	LAM4-Eo
Régulation épigénétique	t(v;11q23)	<i>MLL</i> : régulation de la transcription de gènes homéotiques, notamment les gènes <i>HOX</i> , uniquement exprimés normalement dans les cellules souches hématopoïétiques	<i>MLL-partenaire</i>	Activation transcriptionnelle des gènes homéotiques cibles de <i>MLL</i> sauvage, modifiant la capacité de différenciation hématopoïétique des cellules et provoquant l'expansion d'un clone tumoral dédifférencié	LAM monocytaires (M4, M5) LAM secondaires post-chimiothérapie à base d'inhibiteurs de la topo-isomérase II)
Régulation de l'apoptose	t(11;18)(q21;q21)	<i>API2</i> : code pour une protéine « inhibiteur de l'apoptose » (c-IAP2) <i>MALT1</i> : paracaspase formant avec <i>BCL-10</i> un complexe protéique capable d'activer NF-κB	<i>API-MALT</i>	Activation constitutive des facteurs de transcription de la famille NF-κB Activité anti-apoptotique	Lymphome du MALT

LMC : leucémie myéloïde chronique ; LAL : leucémie aiguë lymphoblastique ; LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique ; LAM : leucémie aiguë myéloïde ; MALT : *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma*.

acute myeloid leukemia 1), localisé en 21q22. *RUNX1* reconnaît une séquence nucléotidique particulière appelée CBS pour *CBF-binding site*. Cette séquence CBS est présente sur de nombreux gènes intervenant dans la différenciation hématopoïétique, par exemple des gènes codant pour des cytokines (comme l'IL-3 ou le GM-CSF), pour des récepteurs à ces cytokines (comme le CSF1-R), ou pour des protéines spécifiquement myéloïdes (comme la myéloperoxydase). La liaison de *RUNX1* à la séquence CBS de ces gènes est responsable de leur activation transcriptionnelle. *RUNX1* joue ainsi un rôle central dans le développement hématopoïétique normal [16].

Plusieurs translocations réarrangeant ce gène ont été décrites dans les hémopathies myéloïdes et

lymphoïdes, les mieux connues étant la translocation (8;21)(q22;q22) associée à la LAM2 et la translocation (12;21)(p13;q22) décrite dans les LAL-B de l'enfant et de l'adulte jeune.

À titre d'exemple, la protéine chimérique *RUNX1-ETO* (*eight-twenty-one*) ou *RUNX1-RUNX1T1*, induite par la translocation (8;21)(q22;q22), conserve sa capacité d'hétérodimérisation avec *CBFβ* ainsi que le domaine de liaison à l'ADN de *RUNX1*. Le gène partenaire de *RUNX1-ETO*, code pour une protéine participant à un complexe de répression transcriptionnelle. Ainsi, la protéine chimérique *RUNX1-ETO* présente une fonction dominante-négative sur *RUNX1* et va empêcher l'activité physiologique du complexe CBF. D'autres partenaires de translocation de *RUNX1* ont été décrits,

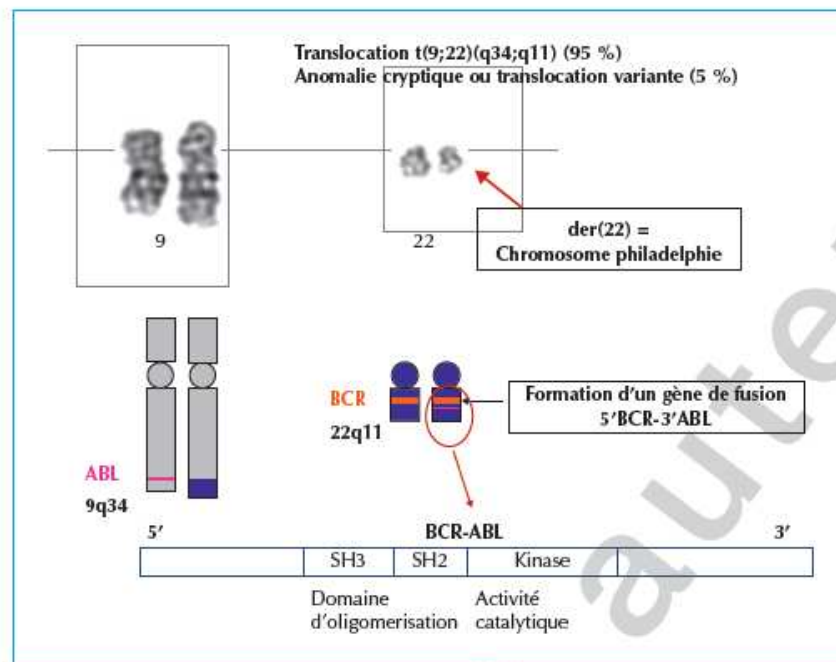


Figure 2. Un exemple de formation d'un gène de fusion, le gène *BCR-ABL*, porté par le chromosome Philadelphie, dérivé 22 de la translocation (9;22)(q34;q11).

comme *EVI1* (*ecotropic viral integration site 1*) en 3q26, ou *MTG16* (*myeloid translocation gene 16*) situé en 16q24. Quel que soit le partenaire, les protéines chimériques formées présentent une fonction de répression de la transcription et exercent un effet dominant-négatif sur *RUNX1*.

La sous-unité β du complexe CBF, de localisation ubiquitaire, n'est codée chez l'homme que par un seul gène, *CBF β* , situé en 16q22. Les réarrangements impliquant le chromosome 16, tels que la translocation (16;16)(p13;q22) et l'inversion péricentrique du chromosome 16 [inv(16)(p13q22)], sont particulièrement décrits au cours des LAM myélomonocytaires avec précurseurs éosinophiles anormaux, ils entraînent une fusion du gène *CBF β* avec le gène *MYH11* (*myosin heavy chain 11*) codant physiologiquement pour une protéine de la famille des myosines de type II du muscle lisse. La protéine de fusion *CBF β -MYH11* conserve le domaine de liaison de *CBF β* à *RUNX1*, aboutissant à la formation d'un complexe protéique aberrant *CBF β -MYH11/RUNX1* ; celui-ci reste théoriquement capable de se lier aux séquences CBS mais forme des dimères ou multimères en raison de la présence du domaine carboxyterminal de *MYH11*, responsable physiologiquement de l'oligomérisation de cette protéine. Cette oligomérisation provoque l'effet

dominant-négatif de *CBF β -MYH11* sur *RUNX1* par différents mécanismes. En effet, *CBF β -MYH11* séquestre *RUNX1* dans le cytoplasme en se liant aux protéines cytosquelettiques. Par ailleurs, il réprime activement la transcription de *RUNX1* dans le noyau en recrutant des corépresseurs et il interfère avec des sites *enhancers* de *RUNX1*.

La translocation (15;17)(q22;q21), caractéristique de la leucémie aiguë promyélocytaire (APL), provoque également la formation d'une protéine chimérique à effet dominant-négatif. Cette aberration chromosomique implique les gènes *PML* (15q22) et *RAR α* (17q21) et aboutit à la formation d'un gène de fusion *PML-RAR α* porté par le dérivé 15 de la translocation.

Le gène *RAR α* code pour le récepteur à l'acide rétinique, un facteur de transcription ligand-dépendant, qui intervient dans la différenciation de la lignée granulocytaire. En l'absence de son ligand, *RAR α* forme un hétérodimère avec *retinoid X receptor* (RXR), se lie à ses éléments de réponses (RARE) situés dans le promoteur de ses gènes cibles, puis recrute un complexe répresseur multiprotéique (SMRT) régulant négativement la transcription des gènes cibles par le biais de modifications épigénétiques. En effet, *RAR-RXR* associé à SMRT recrutent des histones-desacétylases provoquant une condensation chromatinienne et

une répression transcriptionnelle. À des concentrations physiologiques, l'acide rétinoïque désadapte le complexe protéique de corépression SMRT du dimère RAR α -RXR et permet le recrutement d'un complexe co-activateur SRC1 s'associant à des enzymes histones-acétyltransférases (HAT). L'activité de celles-ci entraîne une décompaction chromatinienne et une activation transcriptionnelle des gènes cibles de RAR α impliqués dans la différenciation granulocytaire.

Le gène *PML* est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans le contrôle de la stabilité génomique, notamment *via* des complexes multiprotéiques appelés corps nucléaires PML.

Suite à la translocation (15;17)(q22;q21), la protéine chimérique PML-RAR α s'homodimérise et se lie aux éléments de réponses RARE, mais elle présente une affinité pour le complexe corépresseur SMRT bien supérieure à celle du dimère RAR α -RXR. Ainsi, même en présence d'acide rétinoïque à la concentration physiologique, ce complexe SMRT reste lié à PML-RAR α . De cette façon, PML-RAR α inhibe la transcription des gènes cibles de RAR α et agit comme répresseur du signal rétinoïque par un effet dominant-négatif. Cette répression peut, toutefois, être supprimée par des doses pharmacologiques d'acide rétinoïque (acide tout-transrétinoïque ou *all-transretinoic acid* [ATRA]), ce qui fait de cette pathologie un exemple de thérapie ciblée que nous développerons ultérieurement.

Modifications épigénétiques

Le gène *MLL* (*myeloid lymphoid leukemia 1*) est, à ce jour, le gène le plus souvent impliqué dans les translocations à l'origine d'hémopathies. À l'heure actuelle, plus de 70 translocations ont été décrites et plus de 50 gènes partenaires ont été identifiés [17].

La protéine MLL est une méthyltransférase connue pour jouer un rôle important dans le développement embryonnaire et l'hématopoïèse [18]. En effet, par la méthylation des histones, MLL intervient dans la régulation de la transcription de gènes homéotiques et induit notamment l'activation transcriptionnelle des gènes *HOX* et de leur cofacteur, le gène *MEIS*. Ces gènes régulent physiologiquement l'hématopoïèse et ne sont exprimés que dans les cellules souches hématopoïétiques [19]. La protéine MLL possède, entre autres, un domaine aminoterminal de liaison à l'ADN et un domaine SET carboxyterminal possédant l'activité histone-méthyltransférase. Le résultat d'une transloca-

tion faisant intervenir *MLL* conduit systématiquement à la perte du domaine SET de la protéine. La fonction de régulation transcriptionnelle de la protéine de fusion MLL-partenaire est donc entièrement dépendante de l'activité transcriptionnelle de la protéine partenaire.

Les partenaires de fusion du gène *MLL* possèdent toujours une fonction d'activation transcriptionnelle que ce soit *via* leur domaine d'oligomérisation (AF6, GAS7, etc.), *via* une activité HAT (CBP) ou par activité méthyltransférase (AF9, AF4, ENL, etc.).

Ainsi, la protéine de fusion MLL-partenaire a une forte capacité d'activation transcriptionnelle des gènes homéotiques cibles de MLL, modifiant la capacité de différenciation hématopoïétique normale des cellules, ce qui entraîne l'expansion d'un clone tumoral dédifférencié. L'expression aberrante des protéines HOX empêche la différenciation hématopoïétique normale et est à l'origine de la leucémogénèse. Les points de cassure et les partenaires associés à ces translocations sont nombreux. Les plus connus à l'heure actuelle sont la translocation (4;11)(q21;q23) provoquant un réarrangement *MLL-AF4*, la translocation (11;19)(q23;q13) induisant le réarrangement de *MLL* avec *ENL* et la t(9;11)(p22;q23) entraînant une fusion *MLL-AF9* (*MLL-MLLT3*). Toutes ces protéines partenaires sont des protéines nucléaires ayant une fonction d'activation transcriptionnelle par activité méthyltransférase.

Régulation de l'apoptose

La translocation (11;18)(q21;q21) présente la particularité d'être retrouvée dans le lymphome du MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma*) gastrique. Ce remaniement intéresse le gène *API2* ou *BIRC2* (11q21) codant pour une protéine « inhibiteur de l'apoptose » (c-IAP2) et le gène *MALT1* situé en 18q21 codant pour une paracaspase. Physiologiquement, MALT1 forme avec la protéine BCL-10 un complexe capable d'activer directement NF- κ B, protéine appartenant à une famille de facteurs transcriptionnels induisant la transcription de gènes anti-apoptotiques [20]. À l'état physiologique, la protéine MALT1 est rapidement dégradée par l'intermédiaire du protéasome, tout comme c-IAP2.

La protéine chimérique API-MALT codée par le gène de fusion parvient à mimer le signal induit par le complexe protéique MALT1-BCL10 et entraîne une activation constitutive de la voie NF- κ B. Cette protéine de fusion extrêmement stable est résistante à la voie

de dégradation du protéasome. Il en résulte donc une activité anti-apoptotique par transcription des gènes anti-apoptotiques cibles de NF- κ B, probablement à l'origine de la lymphoprolifération retrouvée dans le lymphome du MALT gastrique.

Translocation et activation transcriptionnelle d'un oncogène

La première translocation récurrente responsable de l'activation d'un oncogène a été décrite en 1976 dans le lymphome de Burkitt et correspond à la t(8;14)(q24;q32), ou à ses variantes (2;8)(p12;q24) et (8;22)(q24;q11). La description de l'implication du locus 8q24 de façon commune dans les trois translocations a permis la compréhension du mécanisme oncogénique et le passage des chromosomes aux gènes [21]. En effet, la localisation des IG sur les chromosomes 2, 22 et 14 laissaient présager un effet de position [22]. Cette hypothèse était vérifiée dans l'année avec l'implication de l'oncogène C-MYC, déjà connu en 8q24. Par la suite, plusieurs translocations présentant le même mécanisme ont été décrites.

Ainsi, la t(8;14)(q24;q32) implique le gène *IGH* (14q32) codant pour la chaîne lourde des Ig et le gène C-MYC (8q24), souvent décrit comme un oncogène à deux faces, en raison de son potentiel d'activation de la prolifération cellulaire et de son effet pro-apoptotique, de même pour les variantes t(2;8)(p12;q24) et t(8;22)(q24;q11), dans lesquelles l'oncogène se retrouve sous le promoteur des gènes *IGK* et *IGL* codant pour les chaînes légères kappa et lambda des immunoglobulines (tableau 2) [23, 24]. L'expression de C-MYC est physiologiquement régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel par divers mécanismes faisant notamment intervenir NF- κ B. Le clonage des points de cassure de la translocation (8;14) a révélé que cet échange chromosomique place le proto-oncogène C-MYC en 14q32 sous l'*enhancer* du gène *IGH* codant pour les chaînes lourdes des Ig : cela aboutit à l'hyperexpression du facteur de transcription C-MYC. Son activation par hétérodimérisation avec MAX entraîne sa fixation à l'ADN, lui permettant d'exercer ses fonctions oncogéniques, comme l'activation du cycle cellulaire et de la synthèse protéique ou l'inhibition de la différenciation cellulaire. De ce fait, les cellules malignes présentent un avantage prolifératif majeur associé à un blocage de la différenciation cellulaire [25].

Au cours des proliférations lymphoïdes B et T, il existe de nombreux exemples de telles aberrations chromosomiques qui affectent, respectivement, les régions régulatrices des gènes des Ig ou du récepteur des cellules T (TCR), et par lesquelles un proto-oncogène, juxtaposé à un *enhancer* fort, se trouve surexprimé ou exprimé de façon ectopique (tableau 2), participant ainsi à l'oncogenèse. En effet, les réarrangements physiologiques subis par les gènes du TCR ou les gènes codant pour les Ig au cours de la différenciation lymphoïde normale impliquent des complexes recombinases qui conduisent, par des cassures doubles-brins sur l'ADN, à la formation de jonctions VDJ [11]. Ce mécanisme prédispose à la survenue de recombinaisons illégitimes entraînant l'apparition de translocations et l'expression aberrante d'oncogènes.

Les partenaires de translocations des gènes du TCR peuvent ainsi correspondre à des gènes codant pour des facteurs transcriptionnels surexprimés (comme *TAL1*) ou des protéines à homéodomaine (comme *HOX11* et *HOX11L2*) dans les LAL-T [26, 27]. Dans le cas particulier des leucémies prolymphocytaires T, les proto-oncogènes surexprimés par la proximité des *enhancers* du TCR α/δ [à savoir *TCL1* lors de l'inv(14)(q11q32)/t(14;14)(q11;q32) ou *MTCP1* par t(X;14)(q28;q11)] interagissent avec la kinase AKT et provoque son activation et son transport nucléaire, ce qui favorise la survie cellulaire [28]. Dans les syndromes lymphoprolifératifs B, les gènes régulant le cycle cellulaire et l'apoptose sont fréquemment mis en cause, comme la cycline D1 dans le lymphome du manteau [translocation (11;14)(q13;q32)] ou *BCL-2* dans le lymphome folliculaire [translocation (14;18)(q32;q21)] [29, 30].

Ce mécanisme d'activation transcriptionnelle, classiquement associée aux pathologies lymphoïdes, a été plus récemment décrit dans les LAM, avec la surexpression du gène *EV11* (en 3q26) sous contrôle des séquences régulatrices de la ribophorine (en 3q21) suite à la survenue d'une inversion paracentrique du chromosome 3 [inv(3)(q21q26)] ou de son équivalent, la translocation réciproque (3;3)(q21;q26) [31]. La ribophorine est une glycoprotéine localisée sur la membrane du réticulum endoplasmique des cellules, l'expression de son gène est donc ubiquitaire et très importante. *EV11* code quant à lui pour une protéine avec domaine de liaison à l'ADN en doigt de zinc ayant un effet répresseur transcriptionnel [31]. Lorsqu'il

Tableau 2. Principaux réarrangements chromosomiques responsables de la surexpression d'une protéine oncogénique.

Surexpression d'une protéine oncogénique				
Anomalie chromosomique	Région régulatrice impliquée	Proto-oncogène impliqué	Fonction	Pathologie
t(8;14)(q24;q32)	<i>IGH</i> en 14q32 : chaîne lourde des immunoglobulines	<i>C-MYC</i> en 8q24 : facteur de transcription, protéine de type bHLH	Activation du cycle cellulaire et inhibition de la différenciation cellulaire	Lymphome de Burkitt
t(2;8)(p12;q24) t(8;22)(q24;q11)	<i>IGL</i> en 2p12 et 22q11 : chaîne légère kappa et lambda des immunoglobulines			
t(11;14)(q13;q32)	<i>IGH</i> en 14q32 : chaîne lourde des immunoglobulines	<i>BCL-1</i> : cycline D1 module l'action des kinases cycline-dépendante	Activation du cycle cellulaire	Lymphome du manteau
t(4;14)(p16;q32)	<i>IGH</i> en 14q32 : chaîne lourde des immunoglobulines	<i>FGFR3</i> : récepteur transmembranaire à activité tyrosine-kinase	Activation de l'activité tyrosine-kinase	LLC
		<i>MMSET</i> : protéine à domaine SET, régulation épigénétique par méthylation des histones	Répresseur transcriptionnel	
t(14;18)(q32;q21)	<i>IGH</i> en 14q32 : chaîne lourde des immunoglobulines	<i>BCL-2</i> : code pour une protéine anti-apoptotique	Inhibition de l'apoptose	Lymphome folliculaire
t(5;14)(q35;q32)	<i>CTIP2</i> : protéine en doigt de zinc fortement exprimée dans le thymus et les lymphocytes T	<i>HOX11L2</i> en 5q35 : protéine à homéodomaine, régulateur transcriptionnel	Expression ectopique Différenciation lymphoïde T	LAL-T
t(1;14)(p32;q11)	<i>TCRα/δ</i> en 14q11.2 : chaîne α/δ du récepteur des cellules T	<i>TAL1</i> en 1p32 : facteur de transcription	Activation de la prolifération, blocage de la différenciation	LAL-T
t(10;14)(q24;q11) t(7;10)(q34;q24)	<i>TCRα/δ</i> en 14q11.2 : chaîne α/δ du récepteur des cellules T <i>TCRβ</i> en 7q34 : chaîne β du récepteur des cellules T	<i>HOX11</i> en 10q24 : protéine à homéodomaine, régulateur transcriptionnel	Augmentation anormale de la transcription des gènes cibles de <i>HOX11</i> impliqués dans l'hématopoïèse	LAL-T

Tableau 2. (Suite)

Surexpression d'une protéine oncogénique				
Anomalie chromosomique	Région régulatrice impliquée	Proto-oncogène impliqué	Fonction	Pathologie
t(14;14)(q11;q32) inv(14)(q11;q32)	TCR α / δ en 14q11.2 : chaîne α / δ du récepteur des cellules T	TC14 en 14q32 : co-activateur de la kinase AKT favorisant la survie cellulaire	Activateur de la kinase AKT	Leucémies prolymphocytaires T
t(X;14)(q28;q11)	TCR α / δ en 14q11.2 : chaîne α / δ du récepteur des cellules T	MTC1 en Xq28 : fonction mal connue, membre de la famille TCR1	Activateur de la kinase AKT	Leucémies prolymphocytaires T
t(7;9)(q34;q34)	TCRB en 7q34 : chaîne β du récepteur des cellules T	NOTCH1 en 9q34 : récepteur de la famille NOTCH (forme tronquée)	Activation de la transcription Différenciation lymphoïde T ++	LAL-T
t(3;3)(q21;q26) inv(3)(q21;q26)	RPN1 en 3q21 : ribophorine	EV11 en 3q26 : facteur de transcription, protéine en doigts de zinc	Activation de la prolifération, blocage de la différenciation	LAM
t(1;14)(p22;q32)	IGH en 14q32 : chaîne lourde des immunoglobulines	BCL-10 en 1p22 : protéine régulatrice de l'apoptose activatrice de NF- κ B	Activation de NF- κ B	MALT
t(14;18)(q32;q21)	IGH en 14q32 : chaîne lourde des immunoglobulines	MALT1 en 18q21 : paracaspase activatrice de NF- κ B	Activation de NF- κ B	MALT
t(3;14)(p14.1;q32)	IGH en 14q32 : chaîne lourde des immunoglobulines	FOX1 en 3p14.1 : facteur de transcription	Activation de NF- κ B	MALT
t(2;5)(p23;q35)	NPM en 5q35 : nucléophosmine	ALK en 2p23 : tyrosine-kinase (forme tronquée)	Expression anormale dans les cellules lymphoïdes Inhibition de l'apoptose	Lymphomes anaplasiques T

LAM : leucémie aiguë myéloïde ; MALT : mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma.

est surexprimé, *EV11* inhibe entre autres la voie de signalisation médiée par le TGF β et entraîne ainsi une activation de la prolifération cellulaire, un blocage de la différenciation et une inhibition de l'apoptose induite par le TGF β .

En règle générale, dans les remaniements décrits ci-dessus, il existe une surexpression d'une protéine de structure normale. Cependant, dans certaines translocations, la protéine mise sous contrôle de séquences régulatrices présente une forme tronquée. C'est le cas pour la protéine codée par le gène *NOTCH1*, correspondant à l'un des quatre récepteurs de la famille NOTCH, observée dans de rares cas de LAL-T avec t(7;9)(q34;q34) qui, sous une forme tronquée et remaniée avec le gène du TCR β , mime l'action constitutive de la voie NOTCH stimulant la différenciation lymphocytaire T [32, 33].

Conséquences dans la prise en charge des patients

Outre l'intérêt diagnostique de la découverte de ces translocations, la compréhension de la physiopathologie qui en découle a permis le développement de molécules thérapeutiques ciblées, modifiant radicalement le devenir des patients, avec une amélioration de la survie notable.

De plus, la connaissance de ces différents transcrits a conduit à l'emploi en routine de méthodes moléculaires permettant l'évaluation et le suivi « en temps réel » du clone tumoral avec une sensibilité nettement supérieure à la cytologie : c'est l'étude de la « maladie résiduelle » [34]. Les translocations, anomalies clonales, acquises qui disparaissent lors de la mise en rémission, sont désormais utilisées comme marqueur de réponse. Nous n'aborderons ici que le suivi de la maladie résiduelle liée à des anomalies cytogénétiques, il s'intègre cependant dans un suivi plus global de la maladie utilisant d'autres techniques et apporte un élément de plus dans la stratégie décisionnelle de la prise en charge du patient.

Enfin, certaines anomalies chromosomiques constituent parfois un facteur pronostique important pouvant modifier la prise en charge.

Nous développerons ci-dessous les applications pratiques de la mise en évidence de translocations récurrentes dans les hémopathies, en termes de diagnostic, de pronostic et de choix de la stratégie thérapeutique.

Les syndromes myéloprolifératifs

La t(9;22)(q34;q11) présente avant tout un intérêt diagnostique puisqu'elle est présente dans plus de 90 % des cas de LMC.

Sur le plan thérapeutique, elle constitue un des exemples historiques de l'application des thérapies ciblées puisqu'il existe un inhibiteur quasi sélectif de l'activité tyrosine-kinase de BCR-ABL : l'imatinib.

L'imatinib est un dérivé 2-phényl-amino-pyrimidine, de la famille des tyrphostines. Il bloque spécifiquement l'activité tyrosine-kinase constitutive de la protéine BCR-ABL. Il exerce son activité anti-tyrosine-kinase en se substituant à l'adénosine triphosphate (ATP) dans le site catalytique de l'enzyme. C'est un analogue spécifique des tyrosines-kinases de la famille ABL. De cette façon, la fixation de l'ATP est impossible et l'imatinib empêche ainsi la phosphorylation des substrats normalement effectuée via l'ATP. Il en résulte un blocage intracellulaire de la cascade des protéines kinases (MAP, JAK, etc.) activées par la protéine BCR-ABL. Ainsi, l'imatinib perturbe la transcription des gènes de régulation du cycle cellulaire, des phénomènes d'adhésion, d'organisation du cytosquelette, et provoque la mort des cellules porteuses du chromosome Philadelphie [35].

Cette molécule a littéralement transformé la prise en charge de la LMC, devenant le traitement de référence en première ligne dans la LMC en phase chronique, supplantant ainsi l'allogreffe de CSH. Utilisé en première ligne, l'imatinib permet d'espérer une survie globale de 89 % à cinq ans et de 85 % à huit ans, avec une survie sans événement de sept ans pour 81 % des patients [36, 37]. Aujourd'hui, des inhibiteurs de deuxième génération utilisés en première ligne de traitement permettent l'obtention de taux de réponse cytogénétique complète à 12 mois plus élevés que lors de l'utilisation de l'imatinib, prédictif d'une meilleure survie sans événement à long terme [38].

Une autre révolution dans la LMC a été permise par la standardisation, à l'échelle internationale, de l'évaluation par quantification en RQ-PCR du transcrit BCR-ABL sanguin, permettant de suivre au plus près la réponse moléculaire en cours de traitement, et d'apporter une sanction thérapeutique adaptée au comportement du clone tumoral. L'évaluation de la réponse à l'imatinib doit s'envisager dorénavant à l'échelle cytologique, cytogénétique et moléculaire [39].

Parmi les syndromes myéloprolifératifs Phi-négatifs, le syndrome hyperéosinophilique avec transcrite de fusion FIP1L1-PDGRF α est également sensible à l'imatinib, ce qui permet d'obtenir chez ces patients une réponse hématologique rapide, puis une efficacité moléculaire qui s'avère durable, tant que le traitement est poursuivi.

Leucémies aiguës lymphoblastiques

Cinq pour cent des LAL de l'enfant et environ 33 % des LAL de l'adulte présentent un réarrangement BCR-ABL avec formation d'une protéine chimérique de 210 kDa (identique à celle de la LMC) dans 33 % des cas et de 180 kDa pour les 66 % restants [40]. Historiquement, cette translocation était associée à un pronostic très sombre, essentiellement en raison d'une très faible chimiosensibilité. Là encore, l'imatinib a nettement modifié le pronostic, permettant la rémission complète dans 90 % des cas lors de son association à une polychimiothérapie, voire dans plus de 95 % des cas en monothérapie dans certaines cohortes de patients plus âgés. Ces résultats sont, cependant, à modérer par les difficultés rencontrées pour maintenir cette rémission sans greffe allogénique. Finalement, l'apport de l'imatinib est important dans cette sous-population de LAL, car il permet l'obtention de réponse complète. L'absence de durabilité est liée à l'acquisition rapide en cours de traitement de mutations conduisant à la résistance à l'imatinib [41].

De la même façon que dans la LMC, le suivi de la maladie résiduelle par biologie moléculaire est très important pour optimiser la prise en charge thérapeutique.

Le transcrite de fusion *TEL-AML1* (*TEL-RUNX1*), associé à la translocation (12;21), est reconnu comme d'excellent pronostic dans la LAL-B de l'enfant et de l'adulte jeune, indépendamment de l'âge du patient et de la leucocytose au diagnostic, avec une survie sans événement approchant les 90 %.

Les réarrangements de MLL ont une fréquence de l'ordre de 13 % dans les LAL-B de l'adulte. L'impact pronostique semble constamment défavorable (indiscutablement pour MLL-AF4), même si certains partenaires sont décrits comme moins péjoratifs (MLL-AF9 serait moins défavorable, surtout chez l'enfant) [6].

La translocation (1;19)(q23;q13) est retrouvée dans 6 % des LAL-B et 25 % des LAL pré-B. Elle entraîne la fusion des gènes *E2A*, essentiel à l'engagement vers la diffé-

renciation B, avec *PBX1*. Cette translocation est reliée à un pronostic plus défavorable chez l'adulte.

Pour les pathologies suscitées, aucune thérapie ciblée n'est disponible pour le moment. En revanche, chaque anomalie génomique constitue un marqueur chromosomique et moléculaire de réponse intéressant pour le suivi sous traitement.

Leucémies aiguës myéloblastiques

Aujourd'hui, plus de 749 translocations équilibrées conduisant à des gènes de fusion ont été décrites dans les LAM [42].

Le plus bel exemple de l'impact pratique apporté par la connaissance approfondie des translocations chromosomiques dans ce sous-groupe d'hémopathies myéloïdes malignes est celui de la APL [43-45]. L'anomalie retrouvée [la translocation (15;17)(q22;q21)] est pathognomonique de la maladie, elle présente donc un intérêt diagnostique indiscutable.

Il existe une thérapie ciblée constituée par l'ATRA. En effet des doses pharmacologiques d'acide rétinoïque permettent de passer outre la répression transcriptionnelle induite par le transcrite de fusion *PML-RAR α* sur les gènes de la différenciation granulocytaire, et ce essentiellement par deux mécanismes :

- l'acide rétinoïque induit une modification de la structure tridimensionnelle de *PML-RAR α* , permettant ainsi sa dissociation du complexe de corépression SMRT et le recrutement du complexe co-activateur SRC1 ayant une action acétyltransférase. Il s'ensuit une modification tridimensionnelle de la chromatine permettant l'accès de la machinerie transcriptionnelle aux gènes d'intérêt et aboutissant à une reprise de la différenciation myéloïde ;
- l'acide rétinoïque augmente l'expression de facteurs nécessaires à la destruction de *PML-RAR α* médiée par le protéasome après ubiquitinylation, favorisant donc l'élimination de ce transcrite.

Historiquement, les résultats obtenus pour une LAM3 traitée par chimiothérapie conventionnelle associant anthracyclines et cytarabine étaient l'obtention d'une RC dans 75 à 80 % des cas, d'une durée médiane d'environ 11 à 25 mois. La survie sans maladie à cinq ans ne dépassait pas 35 à 45 %.

L'emploi d'ATRA à doses pharmacologiques, initialement en monothérapie chez des patients réfractaires à une chimiothérapie conventionnelle, montre un taux de RC comparable à la chimiothérapie

conventionnelle, mais une survie sans évènements à un an de 79 % *versus* 50 % pour la chimiothérapie seule, et une survie sans maladie à cinq ans de 69 % *versus* 29 % pour la chimiothérapie conventionnelle.

Finalement, la combinaison de l'ATRA à la chimiothérapie aboutit à une RC dans 90 à 95 % des cas, et à une survie sans maladie à six ans supérieure à 86 % (± 10 %) sous-réserve de consolidations intensives et d'une chimiothérapie d'entretien.

En pratique, devant une découverte de LAM avec CIVD, l'ATRA est débuté avant même la confirmation cytogénétique de LAM3. En effet, l'introduction précoce d'ATRA a démontré une amélioration du pronostic vital à court terme, en permettant notamment la différenciation des promyélocytes, directement responsables de la libération de facteurs prothrombotiques induisant la CIVD.

Le suivi quantitatif du transcrit *PML-RAR α* au cours de la prise en charge des LAM3 dans le cadre d'un suivi de maladie résiduelle est possible.

Parmi les autres LAM pour lesquelles la recherche de transcrit de fusion est utilisée en pratique quotidienne, on peut citer :

- les LAM associées à une translocation (8;21), observée dans 5 à 10 % des LAM (et dans 20 à 25 % des LAM2), conduisant à la formation du transcrit *AML1-ETO* ;
- les LAM4-Eo avec inv(16) ou t(16;16) réarrangeant *CBF β* et *MYH11*.

Ces deux sous-types de leucémies correspondent au sous-groupe des « LAM-CBF » classées dans le sous-groupe des LAM à cytogénétique favorable, selon la classification MRC de 1998. Elles se caractérisent par une très forte sensibilité du clone tumoral à de fortes doses d'aracytine et un taux de RC supérieur à 90 %. L'ensemble des groupes de travail s'accordent à ne plus allogreffer en première RC les patients de ce sous-groupe de LAM, les rechutes étant plus rares que dans les autres LAM et les résultats de l'allogreffe de CSH en première rechute restant corrects.

Notons que ces LAM-CBF semblent rassembler des pathologies assez hétérogènes sur les plans biologique et moléculaire. L'étude approfondie des anomalies génétiques associées à la translocation d'intérêt, du profil d'expression en micro-ARN des différents clones et, enfin, du profil de la réponse moléculaire précoce au traitement devrait permettre de définir des sous-groupes de CBF plus homogènes et de leur appliquer des options thérapeutiques plus ciblées [46].

Dans les LAM4 et les LAM5 secondaires à des traitements par inhibiteurs des topo-isomérases, il est fréquent (5 à 10 % des cas) de retrouver un réarrangement de la région 11q23, impliquant le gène *MLL*. Les translocations les plus fréquentes sont la t(9;11)(p22;q23), la t(11;19)(q23;p13), la t(6;11)(q27;q23) et la t(10;11)(p11;q23). Elles sont associées à un pronostic défavorable. La t(9;11)(p22;q23) avec transcrit *MLL-AF9* semble associée à un moins mauvais pronostic que les autres LAM avec réarrangement de *MLL*, surtout chez l'enfant [47].

L'existence d'anomalies cytogénétiques récurrentes a fait évoluer la classification des LAM définissant quatre groupes principaux : le premier avec anomalies récurrentes, le deuxième avec dysplasie multilignée, le troisième secondaire à la chimiothérapie et, enfin, le dernier sans catégorisation particulière (classification OMS, 2008).

Ces anomalies cytogénétiques définissent, en outre, une valeur pronostique permettant de faire émerger des sous-groupes de population différents, pris en compte dans une dernière classification établie par l'European LeukemiaNet (ELN) en 2010. Ainsi, on distingue quatre groupes pronostiques : favorable, intermédiaire 1, intermédiaire 2 et défavorable en fonction des anomalies cytogénétiques et des marqueurs moléculaires retrouvés, à savoir les statuts mutationnels des gènes *NPM1*, *FLT3* et *CEBP α* (tableau 3) [48].

De ce constat a découlé une modification importante de la prise en charge des patients : l'allogreffe n'est plus le traitement de référence en première RC chez les patients avec LAM de bon pronostic.

Pathologies lymphomateuses

Le diagnostic des pathologies lymphomateuses repose sur un faisceau de critères cytologiques, histologiques, cytogénétiques et immunohistochimiques précis. Les différentes translocations retrouvées dans ces pathologies sont détaillées dans le tableau 2. Certaines d'entre elles sont fortement associées à un type de lymphome, notamment la t(11;14) du lymphome du manteau ou la t(14;18) du lymphome folliculaire, sans être pour autant pathognomonique.

Une fois le diagnostic formellement établi, l'impact direct de ces translocations sur le pronostic et la mise en place d'une stratégie thérapeutique adaptée est, cependant, limité. L'intérêt de leur mise en évidence reste surtout diagnostique, comme pour la t(8;14) dans le

Tableau 3. Sous-groupes pronostiques, cytogénétiques et moléculaires dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), recommandations de l'European LeukemiaNet (ELN) en 2010.

Sous-groupes	Anomalies cytogénétiques	Transcrit de fusion mutations
Favorable	t(15;17)(q22;q21)	<i>PML-RARα</i>
	t(8;21)(q22;q22)*	<i>RUNX1-RUNX1T1</i> ^a
	inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)*	<i>CBFβ-MYH11</i> ^a
	Cytogénétique normale	Mutation <i>NPM1</i> sans duplication <i>FLT3-ITD</i>
Intermédiaire 1		Mutation <i>CEBPA</i> sans mutation <i>FLT3-ITD</i>
	Cytogénétique normale	Mutations <i>NPM1</i> et <i>FLT3-ITD</i>
	Cytogénétique normale	<i>NPM1</i> sauvage et mutation <i>FLT3-ITD</i>
	Cytogénétique normale	<i>NPM1</i> sauvage sans mutation <i>FLT3-ITD</i>
Intermédiaire 2	t(9;11)(p22;q23)	<i>MLL3-MLL</i>
	Autres anomalies non complexes	
Défavorable	t(6;9)(p23;q34)	<i>DEK-NUP214</i>
	inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2)	<i>RPN1-EV1</i>
	t(v;11q23)	Réarrangement <i>MLL</i>
	del(5q), -5, -7, abnl(17p)	
	Caryotype complexe ^b	

^aleucémie aiguë myéloïde-core-binding factor (LAM-CBF).

^bTrois anomalies ou plus, en l'absence d'une des translocations ou des inversions récurrentes, telles que définies dans la classification OMS, 2008, c'est-à-dire t(15;17), t(8;21), inv(16) ou t(16;16), t(9;11), t(v;11q23), t(6;9), inv(3)/t(3;3).

lymphome de Burkitt qui nécessite une prise en charge thérapeutique intensive du fait de son agressivité.

Il faut noter, néanmoins, le cas des lymphomes du MALT gastriques associés à la présence d'une t(11;18), réarrangeant *API2* et *MALT1*. La présence de cette t(11;18) dans 40 % des cas de lymphome du MALT

gastriques est prédictive d'une absence de réponse à la simple éradication par antibiotiques d'*Helicobacter pylori*, et permet en pratique de débiter plus rapidement un traitement spécifique [49].

Oncogenèse et onco-hématologie

La découverte de translocations récurrentes dans les hémopathies malignes permet certes de mieux comprendre l'oncogenèse de certaines d'entre elles. Cependant, ces réarrangements ne semblent pas toujours capable, à eux seuls, d'entraîner un processus leucémique, comme le souligne par exemple la fréquence élevée de t(14;18)(q32;q21) chez l'individu sain [50, 51] ou encore l'analyse de sangs de cordons dans lesquels les gènes de fusion *AML1-ETO* et *TEL-AML1* sont 100 fois plus fréquent que l'incidence de LAM associées [52]. Une coopération oncogénique apparaît donc indispensable pour le développement d'un phénotype tumoral, ce qui confirme qu'en onco-hématologie, tout comme dans les tumeurs malignes solides, l'oncogenèse correspond à de multiples altérations moléculaires successives (mécanisme multi-étapes) [53]. C'est les cas de mutations ponctuelles qui entraînent une activation constitutive de protéines de signalisation (RAS) ou de récepteurs à activité tyrosine-kinase (FLT3, cKit) et qui peuvent être retrouvées en association avec des protéines de fusion [54, 55].

En onco-hématologie, l'hypothèse de deux événements (*two-hits hypothesis*) est classiquement proposée, avec survenue consécutive de deux classes de mutations ou d'altérations génomiques, l'une donnant un avantage prolifératif, l'autre un blocage de différenciation [56]. Selon ce mécanisme, dans un grand nombre de LAL-T, on observe l'association d'un facteur de transcription surexprimé et d'une délétion du gène suppresseur de tumeur [57]. Cependant, cet exemple est une exception dans la leucémogénèse où peu de gènes suppresseurs de tumeurs sont impliqués, contrairement aux tumeurs solides qui présentent fréquemment une inactivation du locus P19/P16, situé en 9p21. Ce rôle serait déjà joué par les oncoprotéines de fusion dans les leucémies et ne nécessiterait pas de mutations génétiques supplémentaires [58].

À l'inverse, il existe des exemples de double réarrangement, comme l'association des réarrangements *IGH-BCL2* et *IGH-MYC* dans les *double-hit lymphomas*, où l'association de deux mécanismes oncogéniques

aboutit à une forme de lymphome plus agressive avec un pronostic très défavorable [59].

Il faut, enfin, préciser qu'à l'exclusion de la trisomie 21, connue pour prédisposer à la survenue de LAM, il n'existe aucune anomalie héréditaire de nombre ou de structure des chromosomes conduisant au développement d'une hémopathie.

Conclusion

Il est, désormais, admis que l'oncogénèse est liée à la survenue de multiples événements permettant aux cellules cancéreuses d'acquies de nouvelles propriétés, parmi lesquelles une capacité de survie et de prolifération, en dehors de tous signaux de contrôle.

L'étude des translocations récurrentes en onco-hématologie a contribué à la compréhension de ces mécanismes. Elle constitue un outil diagnostique indispensable dans certaines hémopathies et a permis le développement de molécules de thérapie ciblée. De plus, ces anomalies cytogénétiques sont utilisées comme marqueur pronostique dans certaines hémopathies au moment du diagnostic. Le développement de la biologie moléculaire en a fait un marqueur de maladie résiduelle fiable bien meilleur que les marqueurs sériques en tumeurs solides, car plus sensible et spécifique.

L'étude de ces anomalies cytogénétiques n'est plus le domaine exclusif de l'onco-hématologie et tend à s'étendre à l'étude des carcinomes depuis une vingtaine d'années. Elle a permis de mettre en évidence l'implication de voies de signalisations communes dans les mécanismes d'oncogénèse et offre de nouvelles perspectives diagnostiques et thérapeutiques dans la prise en charge des tumeurs solides. ▼

Conflits d'intérêts : aucun.

Références

- Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132: 1497.
- Rowley JD. Letter: a new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290-3.
- Bartram CR, De Klein A, Hagemeijer A, et al. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 1983; 306: 277-80.
- de Klein A, Van Kessel AG, Grosveld G, et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 1982; 300: 765-7.
- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, BCR, on chromosome 22. *Cell* 1984; 36: 93-9.
- Gisselbrecht S. Oncogenes and leukemia: history and perspectives. *Med Sci* 2003; 19: 201-10.
- Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372: 143-9.
- Nguyen Khac F, Bernard OA. Chromosomal translocations in human malignant hematopoiesis. Structural and functional consequences. *Pathol Biol* 2003; 51: 382-9.
- Berger R. Human cytogenetics. From 1956 to 2006. *Pathol Biol* 2007; 55: 1-12.
- Fröhling S, Döhner H. Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 722-34.
- Pasternak G, Hochhaus A, Schultheis B, et al. Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998; 124: 643-60.
- Carron C, Lopez R, Cormier F. Implication of TEL-derived proteins in oncogenesis. *Hématologie* 1999; 5: 143-52.
- Joussot C, Carron C, Boureux B, et al. A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein. *EMBO J* 1997; 16: 69-82.
- Link KA, Chou FS, Mulloy JC. Core binding factor at the crossroads: determining the fate of the HSC. *J Cell Physiol* 2010; 222: 50-6.
- Hart SM, Foroni L. Core binding factor genes and human leukemia. *Hématologica* 2002; 87: 1307-23.
- Cai Z, De Bruijn M, Ma X, et al. Haploinsufficiency of AML1 affects the temporal and spatial generation of hematopoietic stem cells in the mouse embryo. *Immunity* 2000; 13: 423-31.
- Huret JL, Dessen P, Bernheim A. An Internet database on genetics in oncology. *Oncogene* 2003; 22: 1907.
- Liu H, Cheng EHY, Hsieh JJD. MLL fusions: pathways to leukemia. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 1204-11.
- Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 823-33.
- Hosokawa Y. Anti-apoptotic action of API2-MALT1 fusion protein involved in t(11;18)(q21;q21) MALT lymphoma. *Apoptosis* 2005; 10: 25-34.
- Bernheim A, Berger R, Lenoir G. Translocations t(2;8) and t(8;22) in continuous cell lines of African Burkitt's lymphoma. *C R Seances Acad Sci D* 1980; 291: 237-9.
- Lenoir GM, Preud'homme JL, Bernheim A, et al. Correlation between immunoglobulin light chain expression and variant translocation in Burkitt's lymphoma. *Nature* 1982; 298: 474-6.
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, et al. Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 7824-7.
- Taub R, Kirsch I, Morton C, et al. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 7837-41.
- Delsol G. Molecular abnormalities in lymphomas. *Bull Cancer* 2010; 97: 1347-64.
- Zhu J, Emerson SG. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 2002; 21: 3295-313.
- Bernard OA, Busson-LeConiat M, Ballerini P, et al. A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5;14)(q35;q32), is associated with expression of the Hox11L2 gene in T acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001; 15: 1495-504.
- Künstle G, Laine J, Pierron G, et al. Identification of Akt association and oligomerization domains of the Akt kinase coactivator TCL1. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 1513-25.

29. Raffeld M, Jaffe ES. Bcl-1, t(11;14), and mantle cell-derived lymphomas. *Blood* 1991; 78: 259-63.
30. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, et al. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985; 229: 1390-3.
31. Levy ER, Parganas E, Morishita K, et al. DNA rearrangements proximal to the EVI1 locus associated with the 3q21q26 syndrome. *Blood* 1994; 83: 1348-54.
32. Ferrando AA. The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009; 353-61.
33. Bernard O. Mechanisms of leucemogenesis. *Bull Cancer* 2010; 97: 1381-8.
34. Szczepański T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia* 2007; 21: 622-6.
35. Deininger MW, Druker BJ. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 401-23.
36. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2009; 23: 1054-61.
37. Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, et al. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the international randomized study of interferon and ST1571 (IRIS). *Blood* 2010; 116: 3758-65.
38. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 362: 2260-70.
39. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006; 108: 28-37.
40. Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6306-15.
41. Ottmann OG, Pfeifer H. First-line treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia in adults. *Curr Opin Oncol* 2009; 21(suppl. 1): S43-6.
42. Martens JHA, Stunnenberg HG. The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia. *FEBS Lett* 2010; 584: 2662-9.
43. Lo-Coco F, Ammatuna E. The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 514: 156-61.
44. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 2008; 111: 2505-15.
45. Petrie K, Zelent A, Waxman S. Differentiation therapy of acute myeloid leukemia: past, present and future. *Curr Opin Hematol* 2009; 16: 84-91.
46. Dombret H, Preudhomme C, Boissel N. Core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML): is high-dose Ara-C (HDAC) consolidation as effective as you think? *Curr Opin Hematol* 2009; 16: 92-7.
47. Bacher U, Schnittger S, Haferlach T. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol* 2010; 22: 646-55.
48. Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010; 115: 453-74.
49. Liu H, Ruskon-Fourmestreaux A, Lavergne-Slove A, et al. Resistance of t(11;18) positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Lancet* 2001; 357: 39-40.
50. Janz S, Potter M, Rabkin CS. Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36: 211-23.
51. Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, et al. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 8910-4.
52. Mori H, Colman SM, Xiao Z, et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8242-7.
53. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-70.
54. Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, et al. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell* 2002; 1: 433-43.
55. Liao AT, Chien MB, Shenoy N, et al. Inhibition of constitutively active forms of mutant kit by multitargeted indolinone tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2002; 100: 585-93.
56. Gilliland DG, Tallman MS. Focus on acute leukemias. *Cancer Cell* 2002; 1: 417-20.
57. Drexler HG. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes *p15*, *p16*, *p18* and *p19* in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia* 1998; 12: 845-59.
58. Linggi B, Müller-Tidow C, van de Locht L, et al. The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 2002; 8: 743-50.
59. Snuderl M, Kolman OK, Chen YB, et al. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2010; 4: 327-40.

ARTICLE 10

NGUYEN-KHAC F, LAMBERT J, CHAPIRO E, GRELLIER A, MOULD S, BARIN C, DAUDIGNON A, GACHARD N, STRUSKI S, HENRY C, PENTHER D, MOSSAFA H, ANDRIEUX J, ECLACHE V, BILHOU-NABERA C, LUQUET I, TERRE C, BARANGER L, MUGNERET F, CHIESA J, MOZZICONACCI MJ, CALLET-BAUCHU E, **VERONESE L**, BLONS H, OWEN R, LEJEUNE J, CHEVRET S, MERLE-BERAL H, LEBLOND V; Groupe Français d'Etude de la Leucémie Lymphoïde Chronique et Maladie de Waldenström (GFCLL/MW); Groupe Ouest-Est d'étude des Leucémie Aiguës et Autres Maladies du Sang (GOELAMS); Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). **Chromosomal aberrations and their prognostic value in a series of 174 untreated patients with Waldenström's macroglobulinemia.** *Haematologica* 2013 Apr;98(4):649-54

La maladie de Waldenström est une pathologie des cellules B matures pour laquelle les mécanismes génétiques demeurent mal connus : peu d'anomalies chromosomiques récurrentes ont été décrites, et leur valeur pronostique n'est pas établie.

Nous avons mené une étude cytogénétique prospective et nous avons examiné la valeur pronostique des aberrations chromosomiques de la maladie de Waldenström au cours d'un essai randomisé international.

Les anomalies les plus fréquentes sont la délétion 6q (30%), la trisomie 18 (15%), la délétion 13q (13%), la délétion 17p avec perte de *TP53* (8%), la trisomie 4 (8%) et la délétion 11q avec perte d'*ATM* (7%). Il existe une association significative entre trisomie 4 et trisomie 18. Les translocations impliquant les gènes des immunoglobulines sont rares (<5%). Les délétions 6q et 11q, et la trisomie 4 sont significativement associées à des paramètres cliniques et biologiques péjoratifs. Les patients avec délétion *TP53* présentent une survie sans progression raccourcie. Bien que peu fréquente, la trisomie 12 est également associée à une survie sans progression raccourcie.

En conclusion, le profil cytogénétique de la maladie de Waldenström semble différer de celui des autres lymphomes à cellules B. Les anomalies chromosomiques, combinées aux autres caractéristiques cliniques et biologiques, peuvent aider au diagnostic et à la détermination du pronostic de cette hémopathie.

Chromosomal aberrations and their prognostic value in a series of 174 untreated patients with Waldenström's macroglobulinemia

Florence Nguyen-Khac,¹ Jerome Lambert,² Elise Chapiro,¹ Aurore Grelier,¹ Sarah Mould,³ Carole Barin,⁴ Agnes Daudignon,⁵ Nathalie Gachard,⁶ Stéphanie Struski,⁷ Catherine Henry,⁸ Dominique Penther,⁹ Hossein Mossafa,¹⁰ Joris Andrieux,¹¹ Virginie Eclache,¹² Chrystèle Bilhou-Nabera,¹³ Isabelle Luquet,¹⁴ Christine Terre,¹⁵ Laurence Baranger,¹⁶ Francine Mugneret,¹⁷ Jean Chiesa,¹⁸ Marie-Joelle Mozziconacci,¹⁹ Evelyne Callet-Bauchu,²⁰ Lauren Veronese,²¹ Hélène Blons,²² Roger Owen,²³ Julie Lejeune,² Sylvie Chevret,² Hélène Merle-Beral,¹ and Véronique Leblond²⁴ on behalf of the Groupe Français d'Etude de la Leucémie Lymphoïde Chronique et Maladie de Waldenström (GFCLL/MW), Groupe Ouest-Est d'étude des Leucémie Aiguës et Autres Maladies du Sang (GOELAMS) and Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA)

¹Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Pitié-Salpêtrière and INSERM U872, UPMC Paris 6, France; ²Hôpital Saint-Louis, DBIM, Paris, France; ³Royal Bournemouth Hospital, UK; ⁴Laboratoire de Cytogénétique, CHRU Bretonneau, Tours, France; ⁵Service d'Hématologie-Immunologie-Cytogénétique, CH de Valenciennes, Valenciennes, France; ⁶Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Dupuytren, Limoges, France; ⁷Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; ⁸Hôpital de Rennes, Rennes, France; ⁹Centre Henri Becquerel, Rouen, France; ¹⁰Laboratoire CERBA Département Génétique, Cergy-pontoise, France; ¹¹Laboratoire de Génétique Médicale, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU de Lille, France; ¹²Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Avicenne, AP-HP, Bobigny, France; ¹³Hôpital Kremlin-Bicêtre, France; ¹⁴Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Robert Debré, Reims, France; ¹⁵Laboratoire de Cytogénétique, Service de Biologie, CH de Versailles, Le Chesnay, France; ¹⁶Hôpital d'Angers, France; ¹⁷Hôpital de Dijon, France; ¹⁸Laboratoire de Cytogénétique, Centre Hospitalier et Universitaire CAREMEAU, Nîmes, France; ¹⁹Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France; ²⁰Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Lyon-Sud, France; ²¹Laboratoire de Cytogénétique, CH de Clermont-Ferrand, France; ²²Laboratoire de Biochimie, UF de Pharmacogénétique et Oncologie Moléculaire, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, F-75015, France; ²³St. James's Institute of Oncology, St James's University Hospital, Leeds, UK; and ²⁴Service d'Hématologie Clinique, Hôpital Pitié-Salpêtrière and Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

ABSTRACT

Waldenström's macroglobulinemia is a disease of mature B cells, the genetic basis of which is poorly understood. Few recurrent chromosomal abnormalities have been reported, and their prognostic value is not known. We conducted a prospective cytogenetic study of Waldenström's macroglobulinemia and examined the prognostic value of chromosomal aberrations in an international randomized trial. The main aberrations were 6q deletions (30%), trisomy 18 (15%), 13q deletions (13%), 17p (*TP53*) deletions (8%), trisomy 4 (8%), and 11q (*ATM*) deletions (7%). There was a significant association between trisomy of chromosome 4 and trisomy of chromosome 18. Translocations involving the *IGH* genes were rare (<5%). Deletion of 6q and 11q, and trisomy 4, were significantly associated with adverse clinical and biological parameters. Patients with *TP53* deletion had short progression-free survival and short disease-free survival. Although rare (<5%), trisomy 12 was associated with short progression-free survival. In conclusion, the cytogenetic profile of Waldenström's macroglobulinemia appears to differ from that of other B-cell lymphomas. Chromosomal abnormalities may help with diagnosis and prognostication, in conjunction with other clinical and biological characteristics. *This trial is registered with Clinicaltrials.gov, numbers NCT00566332 and NCT00608374.*

Introduction

Waldenström's macroglobulinemia (WM) is a disease of mature B cells, the genetic basis of which is poorly understood. Few recurrent chromosomal abnormalities have been reported in WM, partly because of difficulties in obtaining tumor metaphases for karyotyping. Alternative techniques such as fluorescence *in situ* hybridization (FISH) have been used to study this disease. Deletion of the long arm (q) of chromosome 6 is the most common abnormality, being found

in up to 50% of patients.^{1,2} Trisomy 4 and 13q14 and 17p13 deletion have also been described.^{3,5} Deletion of chromosome arm 6q is associated with features of adverse prognosis, and 13q14 and 17p13 deletions are associated with advanced disease stages. More recently, using high-array-based comparative genomic hybridization, Braggio *et al.* observed a recurrent gain in the short arm (p) of chromosome 6.⁶ Most relevant studies have involved both treated and untreated patients, making it difficult to determine the prognostic value of chromosomal abnormalities.

©2013 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper. doi:10.3324/haematol.2012.070458

The online version of this article has a Supplementary Appendix.

Manuscript received on May 21, 2012. Manuscript accepted on September 19, 2012.

Correspondence: florence.nguyen@psl.aphp.fr

To address these issues, we conducted a cytogenetic study of a large series of untreated symptomatic patients enrolled in a prospective, randomized, open-label clinical trial. The WM1 study took place in 101 centers in five countries and enrolled 339 patients with WM, 37 patients with non-MALT marginal zone lymphoma (MZL), and 38 patients with lymphoplasmacytic lymphoma, who were all randomly assigned to receive chlorambucil or fludarabine.⁷

Here we report our cytogenetic findings in 174 of the WM patients enrolled in this trial.

Design and Methods

Patients and the WM1 study

Patients ≥ 18 years old with previously untreated WM and an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status score of ≤ 2 were eligible. To be included, patients had to have an established diagnosis of WM requiring treatment, with a CD20⁺, CD5⁺, CD23⁺, CD10⁺ tumor-cell immunophenotype. Patients were assigned to oral chlorambucil 8 mg/m²/day (6 mg/m²/day if >75 years old) for 10 days every 28 days for a maximum of 12 cycles, or to oral fludarabine 40 mg/m²/day (30 mg/m²/day if >75 years old) for 5 days every 28 days for up to six cycles. The trial was approved by a local ethics committee (CCPRB Pitié-Salpêtrière) and conformed with the Declaration of Helsinki. All the patients gave written informed consent to their participation. The trial is registered with *Clinicaltrials.gov*, numbers NCT00566332 and NCT00608374.

Conventional cytogenetic and fluorescence in situ hybridization studies

Conventional cytogenetic and FISH analyses were performed at enrollment in the trial, between 2001 and 2009. Chromosomal studies were performed for 172 patients: these studies were done by the referring laboratories on bone marrow and/or on peripheral blood when circulating tumor cells were present. Cells were not stimulated (43 patients) or stimulated for 72 h with 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (56 patients) until 2006, and subsequently with CpG-oligonucleotide plus interleukin-2 (21 patients). The type of culture was unknown for 52 patients. Centralized examinations included metaphase karyotyping, and FISH analyses of 6q21 (139 patients), 11q22 (*ATM* locus) (139 patients), 13q14 (145 patients) and 17p13 (*TP53* locus) (140 patients) deletions, trisomy of chromosomes 4 (139 patients), 12 (140 patients) and 18 (117 patients), and translocations involving 14q32 (*IGH* locus) (129 patients). The following probes were used: CEP4, CEP12, 13q14 (D13S319), *ATM*, p53, *IGH*, *BCL2*, *PAX5* (Abbott, Rungis, France), and 6q21 (Kreatech, Illkirch, France). FISH analyses were performed on unselected cultured cells for all but one patient, on interphase nuclei (minimum of 100 counted nuclei) and also on metaphases when available.

TP53 gene sequencing

TP53 variants at exons 4 to 10 were analyzed by direct sequencing in three patients with 17p deletion, as previously described, starting from DNA extracted from cytogenetic pellets.⁸

Statistical analysis

Group-wise comparisons of the distributions of clinical and laboratory variables were conducted using Wilcoxon's test (for quantitative variables) or Fisher's exact test (for qualitative variables). Overall survival was measured from enrollment to death or the last follow-up visit. Progression-free survival was measured from

enrollment to disease progression, death from any cause, or the last follow-up visit. Disease-free survival was measured from the date of response until disease progression or death. Distributions of overall, progression-free and disease-free survival were estimated with the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test.^{9,10}

All tests were two-sided. An effect was considered statistically significant if the *P* value was 0.05 or less. The SAS 9.2 (SAS, Inc., NC, USA) and R 2.10.1 (R Development Core Team, 2006) software packages were used.

Results

Clinical results

The male to female ratio was 2.16, and the mean age was 66.4 years (range, 40.0 to 84.7). The median interval between diagnosis and inclusion in the trial was 2.3 months (Q1=0.69; Q3=14.8). The median follow-up was 40.7 months (Q1=22.1; Q3=60.6). The median percentage of lymphoplasmacytic cells, calculated on bone-marrow smears, was 51.5% (Q1=29%; Q3=75%).

Conventional cytogenetic and fluorescence in situ hybridization analyses

Conventional cytogenetic analysis was successful in 141/172 cases (82%), of which 66 (47%) showed clonal abnormalities (Table 1). Twenty (30%) of the 66 cases with abnormal conventional cytogenetics were complex, with at least three chromosomal changes, and 23 (35%) showed translocations (5 balanced and 18 unbalanced). A t(11;18)(q21;q21) translocation involving *MALT1* was observed in one case. Twenty (30%) of these 66 cases with abnormal conventional cytogenetic findings included loss of sex chromosomes, and this was an isolated abnormality in six other patients. Since the loss of sex chromosomes is common in elderly patients, it may represent a non-specific finding in WM.

FISH analyses with all eight probes, performed in 113 patients, showed a mean of 0.8 (± 0.91) abnormalities per patient (range, 0-5). Of the 113 patients analyzed, 63 (56%) had a FISH abnormality. Among these 63 patients, 41 had a single abnormality, 18 had two abnormalities, three had three abnormalities and one had five abnormalities (Online Supplementary Table S1). Combining results from conventional cytogenetic and FISH studies, the mean number of abnormalities was 1.4 (± 1.77) (range, 0-11). The estimated median percentage of tumor cells carrying a FISH abnormality was 46% (Q1=31; Q3=68).

Using FISH and/or conventional cytogenetics, we observed 6q deletions in 43/141 (30%) cases, trisomy 18 in 17/117 (15%), 13q14 deletion in 19/145 (13%), trisomy 4 in 11/139 (8%), 17p13 (*TP53*) deletions in 11/140 (8%), 11q22 (*ATM*) deletions in 10/139 (7%), trisomy 12 in 6/140 (4%), and 14q32 (*IGH*) translocations in 3/129 (2%). There was one case of t(14;18)(q32;q21) and two translocations with unknown partners (neither *BCL2* nor *PAX5*). In the latter two cases the *IGH* rearrangement was observed only in interphase nuclei.

Deletion of 6q was significantly more frequent in complex karyotypes than in abnormal karyotypes with fewer than three abnormalities [5/9 (57%) versus 7/36 (19%), *P*=0.005] (Online Supplementary Table S2). There was a significant association between trisomy of chromosome 4 and trisomy of chromosome 18; among 11 cases with trisomy

18, trisomy 4 was present in four cases (36%), compared to three cases among the 85 patients (4%) without trisomy 18 ($P=0.003$) (Online Supplementary Table S2). Deletion of 17p was only detected by FISH in four patients (three with a normal karyotype and one with a complex karyotype with two markers) (Table 2). Deletion of 17p was observed in the dominant clone of four patients and in a subclone from one patient. Among seven patients with a translocation, three (43%) had a 17p deletion versus 4/86 (5%) patients without a translocation ($P=0.03$) (Online Supplementary Table S2). When associated with another FISH abnormality, 17p deletion affected a lower proportion of cells in four patients and the same proportion in two patients. Of note,

patients with 17p deletion had a higher percentage of tumor cells in their bone marrow than patients without 17p deletion (median 77% versus 46%, $P=0.01$).

Correlations with prognostic factors

Cytogenetic profiles were comparable across the two treatment arms. The observed chromosomal abnormalities were analyzed with respect to the adverse characteristics included in the International Scoring System for WM (ISSWM), namely age >65 years, hemoglobin ≤ 11.5 g/dL, platelet count $\leq 100 \times 10^9/L$, neutrophil count $\leq 1.5 \times 10^9/L$, albumin <35 g/dL, β_2 -microglobulin >3 mg/L, and IgM >7 g/dL.¹¹ Deletion of 6q was significantly associated with β_2 -microglobulin >3 mg/L [28/73 (38%) versus 15/68 (22%), $P=0.04$], trisomy 4 with β_2 -microglobulin >3 mg/L [10/70 (14%) versus 1/69 (1%), $P=0.009$], and ATM deletion with age >65 years [9/79 (11%) versus 1/60 (2%), $P=0.04$]. Of note, 6q deletion and ATM deletion were also significantly associated with hypoalbuminemia (<35 g/L), another classical factor of poor prognosis [23/48 (48%) versus 20/103 (19%), $P<0.0001$; and 6/40 (15%) versus 4/99 (4%), $P=0.03$, respectively].¹² Finally, trisomy 4 was significantly associated with male gender [11 (100%) versus 85 (66%), $P=0.02$]. Cytogenetic profiles were comparable across the three risk groups defined by the ISSWM.¹¹

We then analyzed the impact of chromosomal abnormalities on the response rate, progression-free survival, disease-free survival and overall survival. The six patients with trisomy 12 had significantly shorter progression-free survival (median 12.2 months versus 31.2 months without trisomy 12; $P=0.004$) (Figure 1A). Deletion of TP53 was associated with shorter progression-free survival in univariate analysis (median 18.7 months versus 30 months without TP53 deletion; $P=0.05$) (Figure 1B), and with shorter disease-free survival (median 7.8 months versus 28.8 months without TP53 deletion; $P=0.001$) (Figure 1C). There was no significant interaction between the effect of trisomy 12 or TP53 deletion and treatment arm. The other abnormalities (abnormal cytogenetic findings, complex karyotype, translocation, deletions of 6q, 13q14 and ATM, trisomy 18 and IGH translocation) had no impact on the response rate, progression-free survival, disease-free survival or overall survival.

TP53 gene sequencing

Finally, we analyzed TP53 sequences (exons 4-10) in three patients with 17p deletion in 13%, 17% and 52% of interphase nuclei (FISH analysis). No mutations were detected.

Discussion

The World Health Organization classification defines WM as a lymphoplasmacytic lymphoma with bone marrow involvement and an IgM monoclonal gammopathy of any concentration.¹³ Until now, no specific chromosomal or genetic abnormalities have been recognized in this malignancy. However, the frequency of individual chromosomal abnormalities observed in WM differs from that in other B-cell neoplasias such as MZL, chronic lymphocytic leukemia (CLL) and multiple myeloma (MM). In particular, 6q deletion and trisomy 4 are more frequent in WM, while 13q14 deletion is less frequent in WM (13% in

Table 1. Summary of cytogenetic findings in 174 WM patients.

Successful karyotyping	141/172 (82%) ^o
Abnormal karyotype	66/141 (47%)
Abnormalities (K) [†] (n=141)	
Median	0
Mean	1.1
Range	0-11
Abnormalities (K)* (n=66)	
Median	1.5
Mean	2.4
Range	1-11
Complex karyotype*	20/66 (30%)
Translocation*	23/66 (35%)
Sex chromosome loss*	20/66 (30%)
6q deletion (K+F)	43/141 (30%)
(K)*	18/66 (27%)
(F)	40/139 (29%)
Trisomy 18 (K+F)	17/117 (15%)
(K)*	8/66 (12%)
(F)	15/117 (13%)
Trisomy 4 (K+F)	11/139 (8%)
(K)*	6/66 (9%)
(F)	10/139 (7%)
Trisomy 12 (K+F)	6/140 (4%) ^{oo}
(K)*	5/66 (8%)
(F)	5/140 (4%)
13q14 deletion (F) [‡]	19/145 (13%)
17p13 (TP53) deletion (F) [‡]	11/140 (8%)
11q22 (ATM) deletion (F) [‡]	10/139 (7%)
14q32 (IGH) translocation (F) [‡]	3/129 (2%) ^o
Abnormalities (F) (n=113)	
Median	1
Mean	0.8
Range	0-5
Abnormalities (K+F) (n=97) ^{ss}	
Median	1
Mean	1.4
Range	0-11

WM: Waldenström's macroglobulinemia; *Karyotyping was performed in 172 of 174 patients. [†]In patients with an abnormal karyotype. K: Observed by karyotyping. K + F: observed by karyotyping and/or FISH. F: observed by FISH. ^oSuccessful karyotype. ^{††}Number of patients with successful karyotyping and analysis with all eight FISH probes to detect: 6q, 13q14, 17p13 (TP53), and 11q22 (ATM) deletions, trisomy 18, 4 and 12, and 14q32 (IGH) translocations. [‡]One t(14;18)(q32;q21) (involving BCL2) and two unknown partners; there were two normal karyotypes and one failure. ^{oo}Karyotype analyses did not detect additional cases. ^{ss}One patient had 4/40 mitoses with trisomy 12 by karyotyping. Trisomy 12 was not observed using FISH.

Table 2. WM patients with 17p13 (*TP53*) deletion.

Patients	Age/ gender	BM Involvement %	Culture	Karyotype	del17p (Interphase FISH (%))	<i>TP53</i> mutation	Other Interphase FISH abnormalities
1*	72/M	82	TPA	49,XY,-3,+21,+add(21)(q),+mar1,+mar2[cp5]/46,XY[15]	7	nd	
2	77/F	47	CpG-ODN+IL-2	45,X,-X,add(17)(p12)[5]/46,XX[15]	50	no	
3	74/M	77	TPA	46,XY[20]	8	nd	del13q (40%)
4	72/M	un	TPA	44,X,-Y,del(6)(q11),der(10)t(10;13)(q22;q12),der(12)t(12;17)(q24;q10-11),-13,-17,+mar[6]/44,X,-Y,idem,add(5)(q35)[4]/46,XY[10]	13	no	del6q (25%)
5	58/M	59	TPA	46,XY,i(17)(q10)[1]/46,XY[29]	10	nd	
6	66/M	87	TPA	45,XY,-17[3]/46,XY[27]	10	nd	
7	63/M	un	TPA	45,X,-Y,del(6)(q22)[4]/46,XY[16]	15	nd	del6q (42%)
8	78/F	86	TPA	46,XX,del(8)(p?11p?21),i(17)(q10)[12]/46,XX[12]	nd	nd	
9	65/M	76	TPA	46,XY,del(6)(q?),add(10)(qter)[6]/45,idem,der(9)t(9;17)(p11;q11),-17[2]/46,XY[12]	13	nd	del6q (26%)
10	62/M	un	TPA	46,XY[30]	17	no	del6q (17%)
11	72/M	un	TPA	46,XY[20]	16	nd	del6q (16%)

Un: unknown. Nd: not determined. No: no *TP53* mutation detected. BM: bone marrow. TPA: 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. CpG-ODN, CpG-oligonucleotide. IL2: interleukin 2; *previously reported in Tene *et al.*, *Leukemia* 2006 (Patient 29).

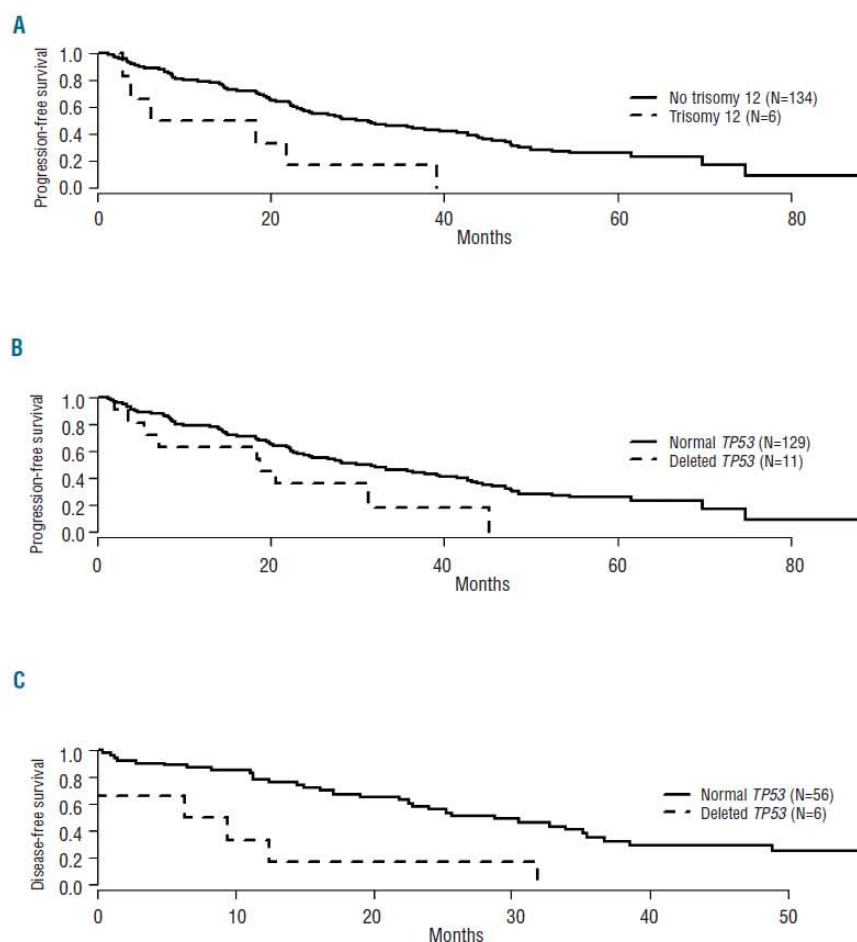


Figure 1. Progression-free survival according to trisomy 12 (A) and *TP53* deletion (B); and disease-free survival according to *TP53* deletion (C).

our series) than in CLL and MM (both ~50%).¹⁴⁻¹⁶ Interestingly, trisomy 18, which is reported to be common in MZL (10-28%), was also frequent in our series of WM (15%), and was significantly associated with trisomy 4.^{17,18} Finally, we confirm that translocations involving the *IGH* gene are very rare in WM (3%), whereas they are reported to be frequent in MM (~40%) and also, although less so, in MZL (~10%).^{16,18,19}

Cytogenetic studies in WM patients have been hampered by the low mitotic index of tumor cells.¹ In the literature, chromosomal abnormalities are reported in only 15% to 32% of patients. The immunostimulatory factor CpG-oligonucleotide, used in combination with interleukin-2, has been reported to induce cell-cycle progression of CLL cells, and has been commonly used as a mitogen for CLL cell culture by cytogeneticists since 2007.^{20,21} Karyotyping was successful in 82% of WM patients and detection of chromosomal abnormalities in 47% of cases. These high percentages could be explained by the fact that patients were symptomatic in our series and had progressive disease, as well as by the addition of CpG-oligonucleotide and interleukin-2.

Deletion of 6q is the most common cytogenetic abnormality reported in WM, and its frequency (38-54%) is much higher than in other B-cell diseases such as CLL (~6%) and MZL (<20%).^{1,2,6,17,22} Two tumor-suppressor genes could be involved in the pathogenesis of WM: *BLIMP-1* on 6q21 and *TNFAIP3* on 6q23.^{6,23} In our series, we detected 6q deletions in 30% of patients, a rate slightly lower than that reported in the literature. One possible explanation is that the FISH probe we used did not cover all deleted regions: several areas of minimal deletion have been reported on the long arm of chromosome 6.^{6,24} In addition, some authors used different approaches, including cell sorting and cytoplasmic immunoglobulin m-FISH, which might be more sensitive.^{6,24} Finally, none of our patients had received treatment for WM prior to the cytogenetic analysis, contrary to previous studies. Although 6q deletion was significantly associated with complex karyotypes in our large series, and with adverse characteristics such as hypoalbuminemia and high β_2 -microglobulin levels, 6q deletion had no adverse impact on patients' outcome, thus confirming the results of smaller studies.^{1,2}

The minimal deleted region on 13q14 seems to be similar in WM and CLL, and includes the microRNA genes miRNA-15a and miRNA-16-1.^{6,25} Deletion of 13q14, when isolated, is associated with a good prognosis in patients with CLL but seems to be associated with disease progression in MM.^{16,22} In contrast, this abnormality had no influence on outcome and was not associated with adverse characteristics in our series of WM. It has been suggested that 13q14 deletions usually arise at the time of disease progression in WM,⁴ but we found some 13q deletions shortly after diagnosis.

We confirmed our previous results regarding the occurrence of trisomy 4 in WM (8%), and found that trisomy 4 was significantly associated with trisomy 18 in our series.^{3,6} As trisomy 4 has not yet been reported in other B-cell malignancies, it might help to distinguish WM from other indolent B-cell disorders. Trisomy 4 was significantly associated with high levels of β_2 -microglobulin in our series but did not influence clinical outcome. Surprisingly, it seemed to be significantly more frequent in males. This might explain the high proportion of males (28/39, 72%) in the first report of trisomy 4 in WM.³

The frequency of 11q22 (*ATM*) deletions is 7-24% in CLL, and this abnormality is often associated with lymphadenopathy and a poor prognosis.^{14,22,26} In our series of WM, 11q deletion was associated with advanced age and hypoalbuminemia but had no impact on clinical outcome.

Deletion of 17p13, including the *TP53* gene, is associated with poor prognosis in many B-cell disorders, including CLL, MZL and MM,^{16,18,22} and its frequency is reported to increase during the course of WM.⁴ In our series, in which the frequency of 17p deletion was 8%, some cases were observed early in the disease course. Like Schop *et al.*, we found that patients with 17p deletion had a higher percentage of tumor cells in their bone marrow.⁴ Unlike other chromosomal abnormalities, which were associated with adverse characteristics but did not affect clinical outcome in our series, *TP53* deletion did not correlate with biological variables. However, *TP53* deletion was associated with a short progression-free survival and short disease-free survival in univariable analyses. Of note, when adjusting for treatment arms and ISSWM risk groups, *TP53* deletion was still associated with shorter progression-free survival and shorter disease-free survival. Our survival analysis showed no difference between WM patients with and without *TP53* deletion, after a median follow-up of 39.7 months, although this needs to be confirmed in the longer term. WM patients with 17p deletion may benefit from adapted treatment, as do CLL patients.

Deletion of 17p is associated with *TP53* mutation in about 80% of CLL patients. Although CLL with 17p deletion but without *TP53* mutation is rare, it has a poor prognosis.²⁷ In MM, 63% of 17p deletions were not associated with *TP53* mutation.²⁸ Few data on *TP53* mutations in WM have been reported. The recently established WM cell line MWCL-1 is reported to carry a monoallelic 17p deletion and a missense mutation in exon 5 of the remaining copy of *TP53*, both anomalies being present in the original patient's biopsy.²⁹ We found no *TP53* mutations in the three WM patients we analyzed, possibly because of the low sensitivity of the sequencing approach and the relatively low percentage of cells with *TP53* deletion (13% and 17%). Alternatively, an inactivating mutation of the second copy of *TP53* might occur later in the disease. Longitudinal studies would allow us to answer this question and to detect the possible appearance of *TP53* abnormalities in *TP53* wild-type patients.

The reported frequencies of trisomy 12 are 11-15% in CLL and 8-15% in MZL.^{18,22} This abnormality is often associated with an atypical morphology and has a controversial prognostic influence in CLL.^{22,30} Trisomy 12 was very rare in our series of WM patients (<5%), and was significantly associated with short progression-free survival. When adjusting for treatment arms and ISSWM risk groups, trisomy 12 was still associated with shorter progression-free survival. In contrast, it did not influence overall survival. Trisomy 12 may reflect a particular aspect of sub-types of B-cell disorders that warrants further investigations.

In conclusion, this study provides the first comprehensive overview of the cytogenetic profile of WM in untreated patients enrolled in a prospective trial. It identifies a pattern of chromosomal abnormalities that may help with diagnosis and prognostication. Treatment strategies in WM have evolved considerably since the inception of this trial and the reported data should be interpreted in the light of these developments. The prognostic values of

TP53 deletion and trisomy 12 need to be confirmed in patients treated with new combinations of treatments with monoclonal antibodies.

Acknowledgments

We thank Dr B Perissel (Hôpital de Clermont-Ferrand), Dr M-J Gregoire (Hôpital de Nancy) and Dr S Ramond (Hôpital Hotel Dieu, Paris) for providing cytogenetic data, L Merlin and I Bouakka (Hôpital Pitié-Salpêtrière) for technical assistance, Prof.

F Davi (Hôpital Pitié-Salpêtrière) for DNA extraction, Dr OA Bernard (INSERM, Villejuif) for revising the manuscript, and E Floc'h (Newmed Publishing Services and Amgen France) for editorial assistance.

Authorship and Disclosures

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at www.haematologica.org.

References

- Ocio EM, Schop RF, Gonzalez B, Van Wier SA, Hernandez-Rivas JM, Gutierrez NC, et al. 6q deletion in Waldenstrom macroglobulinemia is associated with features of adverse prognosis. *Br J Haematol*. 2007;136(1):80-6.
- Chang H, Qi C, Trieu Y, Jiang A, Young KH, Chesney A, et al. Prognostic relevance of 6q deletion in Waldenstrom's macroglobulinemia: a multicenter study. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009;9(1):36-8.
- Terre C, Nguyen-Khac F, Barin C, Mozziconacci MJ, Eclache V, Leonard C, et al. Trisomy 4, a new chromosomal abnormality in Waldenstrom's macroglobulinemia: a study of 39 cases. *Leukemia*. 2006;20(9):1634-6.
- Schop RF, Jalal SM, Van Wier SA, Ahmann GJ, Bailey RJ, Kyle RA, et al. Deletions of 17p13.1 and 13q14 are uncommon in Waldenstrom macroglobulinemia clonal cells and mostly seen at the time of disease progression. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002;132(1):55-60.
- Chang H, Samiee S, Li D, Patterson B, Chen CI, Stewart AK. Analysis of IgH translocations, chromosome 13q14 and 17p13.1(p53) deletions by fluorescence in situ hybridization in Waldenstrom's macroglobulinemia: a single center study of 22 cases. *Leukemia*. 2004;18(6):1160-2.
- Braggio E, Keats JJ, Leleu X, Van Wier S, Jimenez-Zepeda VH, Valdez R, et al. Identification of copy number abnormalities and inactivating mutations in two negative regulators of nuclear factor-kappaB signaling pathways in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Cancer Res*. 2009;69(8):3579-88.
- Leblond V, Lejeune J, Tournilhac O, Morel P, Dillhuydy MS, Dartigeas C, et al. International phase III study of chlorambucil versus flutamide as initial therapy for Waldenstrom's macroglobulinemia and related disorders: results in 414 patients on behalf of FCG CLL/ WM, GOELAMS, GELA, NCRI, ALLG. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2011;118(21):776.
- Le Garff-Tavernier M, Blons H, Nguyen-Khac F, Pannetier M, Brissard M, Gueguen S, et al. Functional assessment of p53 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J*. 2011;1(2):e5.
- Kaplan E, Meier P. Nonparametric Estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;53(282):457-81.
- Peto R, Peto J. Asymptotically efficient rank invariant test procedures. *Journal of the Royal Statistical Society Series A (General)*. 1972;135(2):185-207.
- Morel P, Duhamel A, Gobbi P, Dimopoulos MA, Dhodapkar MV, McCoy J, et al. International prognostic scoring system for Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*. 2009;113(18):4163-70.
- Dimopoulos M, Gika D, Zervas K, Kyrtsos M, Symeonidis A, Anagnostopoulos A, et al. The international staging system for multiple myeloma is applicable in symptomatic Waldenstrom's macroglobulinemia. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(9):1809-13.
- Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:523-31.
- Letestu R, Levy V, Eclache V, Baran-Marszak F, Vaur D, Naguib D, et al. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood*. 2010;116(22):4588-90.
- Sutton L, Chevreton S, Tournilhac O, Divine M, Leblond V, Corrent B, et al. Autologous stem cell transplantation as a first-line treatment strategy for chronic lymphocytic leukemia: a multicenter, randomized, controlled trial from the SFGM-TC and GFLC. *Blood*. 2011;117(23):6109-19.
- Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009;23(12):2210-21.
- Callet-Bauchu E, Baseggio L, Felman P, Traverse-Glehen A, Berger F, Morel D, et al. Cytogenetic analysis delineates a spectrum of chromosomal changes that can distinguish non-MALT marginal zone B-cell lymphomas among mature B-cell entities: a description of 103 cases. *Leukemia*. 2005;19(10):1818-23.
- Salido M, Baro C, Oscier D, Stamatopoulos K, Dierlamm J, Matutes E, et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group. *Blood*. 2010;116(9):1479-88.
- Schop RF, Kuehl WM, Van Wier SA, Ahmann GJ, Price-Troska T, Bailey RJ, et al. Waldenstrom macroglobulinemia neoplastic cells lack immunoglobulin heavy chain locus translocations but have frequent 6q deletions. *Blood*. 2002;100(8):2996-3001.
- Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006;107(2):742-51.
- Dicker F, Schnittger S, Haeflrich T, Kern W, Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood*. 2006;108(9):3152-60.
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910-6.
- Gutierrez NC, Ocío EM, de Las Rivas J, Maiso P, Delgado M, Ferminan E, et al. Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenstrom's macroglobulinemia: comparison with expression patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals. *Leukemia*. 2007;21(3):541-9.
- Schop RF, Van Wier SA, Xu R, Ghobrial I, Ahmann GJ, Greipp PR, et al. 6q deletion discriminates Waldenstrom macroglobulinemia from IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;169(2):150-3.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(24):15524-9.
- Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weillguni T, Bentz M, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 1997;89(7):2516-22.
- Zenz T, Krober A, Scherer K, Habe S, Buhler A, Benner A, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*. 2008;112(8):3322-9.
- Lode L, Eveillard M, Trichet V, Soussi T, Willems S, Richebourg S, et al. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica*. 2010;95(11):1973-6.
- Hodge LS, Novak AJ, Grote DM, Braggio E, Ketterling RP, Manske MK, et al. Establishment and characterization of a novel Waldenstrom macroglobulinemia cell line, MWCL-1. *Blood*. 2011;117(19):e190-7.
- Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol*. 1996;92(2):382-8.

4. PRINCIPE DE LA MLPA (Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification)

La MLPA est une approche moléculaire semi-quantitative qui permet l'exploration et la détection de variations de nombre de copies de plusieurs régions génomiques ciblées au cours de la même réaction. Cette technique, décrite par Schouten *et al.* en 2002 (**Figure 31**), est fondée sur le principe de la PCR multiplexe, avec amplification des sondes spécifiques des séquences génomiques à tester.

Chaque sonde de MLPA est constituée de deux oligonucléotides : un oligonucléotide court, comprenant une séquence spécifique en 3' et une séquence commune marquée en 5', et un oligonucléotide long, constitué d'une séquence spécifique en 5' (dont la cible est adjacente à celle de l'oligonucléotide court) d'une séquence commune non marquée en 3' et d'une séquence intermédiaire de longueur variable. Ces oligonucléotides peuvent être ligués quand ils sont hybridés à leur séquence cible.

Après ligation, les sondes ont toutes des séquences identiques en 5' et en 3' ce qui permet une PCR multiplexe avec un seul couple d'amorces dites universelles. Chaque sonde donne un produit d'amplification de taille unique.

La séparation et la quantification relative des amplicons sont effectuées par électrophorèse capillaire. Lors de l'interprétation, une comparaison avec un témoin normal permet de détecter des délétions (réduction relative du pic de l'amplicon) et des amplifications (augmentation relative du pic de l'amplicon). Les résultats de cette analyse sont assez rapides à obtenir et sont peu coûteux.

Différents kits sont disponibles pour réaliser des études ciblant des régions chromosomiques précises (www.mlpa.com). Il existe en particulier 2 kits dédiés à l'étude des anomalies génomiques classiquement décrites au cours de la LLC (kits P037 et P038, MRC-Holland) ; la localisation des sondes est rapportée dans le **Tableau 11**.

Figure 30 : Principe de la MLPA

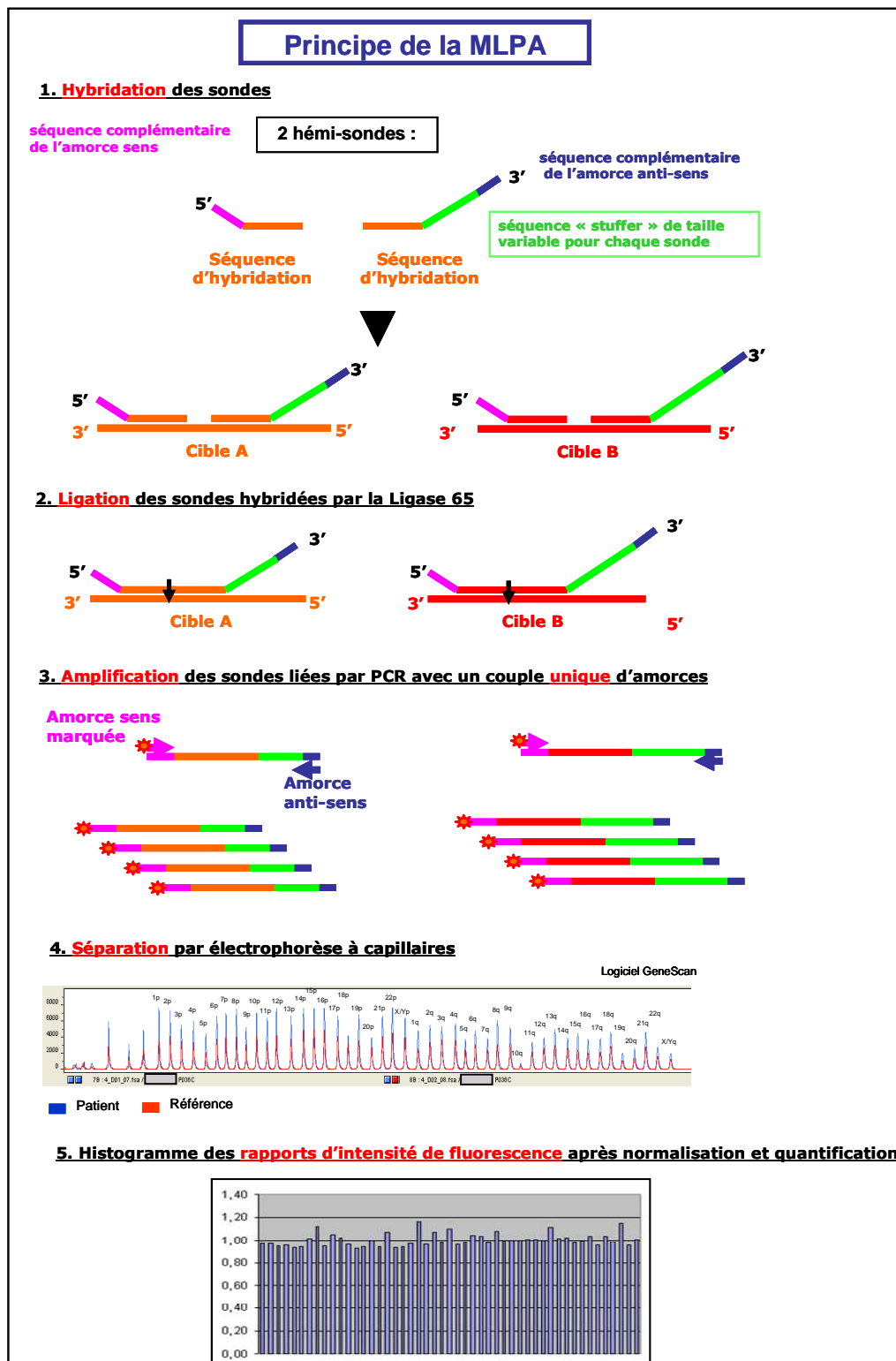


Tableau 11 : Régions chromosomiques ciblées par les sondes de MLPA incluses dans les kits P037 et P038

Target	P037 kit	P038 kit
11q22 (ATM)	2	5
Chromosome 12	5	5
13q14	6	6
17p13	4	4
Chromosome 19	1	4
2p24 (MYCN)	3	-
6q	3	-
8q24 (C-MYC)	3	-
9p21	2	-
10q23 (PTEN)	-	2
18q21	-	1
Control probes	11	13
Total	40	40

|

|

RESUME

La leucémie lymphoïde chronique (LLC), hémopathie lymphoïde fréquente, se caractérise par une évolution clinique extrêmement variable. Bien que les marqueurs de pronostic soit nombreux dans la LLC, aucun n'est univoque. Dans ce contexte, identifier de nouveaux facteurs prédictifs et comprendre la pathophysiologie de marqueurs pronostiques déjà établis constituent deux objectifs importants pour améliorer la prise en charge thérapeutique de cette hémopathie.

Nous avons tout d'abord choisi d'étudier la valeur pronostique et les mécanismes de régulation de l'expression du gène anti-apoptotique *MCL1*. Nous avons montré que l'expression de *MCL1* est un marqueur prédictif de la survie globale parmi l'ensemble des patients et parmi les stades précoces ; ce marqueur est également prédictif de la survie sans traitement des patients en stade A. Ainsi, l'expression de *MCL1* permet d'identifier précocement les formes de LLC à haut risque et faible risque d'évolution défavorable. Nous avons également démontré que l'expression de *MCL1* est fortement corrélée à l'expression de *VEGF*, confirmant le rôle de cette voie de signalisation dans la survie des lymphocytes tumoraux et suggérant que VEGF pourrait réguler positivement l'expression de *MCL1* selon un mode autocrine.

Nous avons ensuite exploré la fonction télomérique en rapport avec les anomalies chromosomiques à valeur pronostique, reflets de l'instabilité génomique. Notre travail a contribué à démontrer la relation entre l'instabilité génomique et le statut télomérique, évalué par la longueur des télomères et l'expression de *hTERT* et des gènes du complexe shelterin. Nous avons ainsi mis en évidence trois groupes de patients présentant des profils cytogénétiques et télomériques distincts : le premier groupe combine une cytogénétique favorable, des télomères longs, une expression faible ou absente de *hTERT* et une expression forte des gènes du complexe shelterin ; le troisième groupe se caractérise par de multiples aberrations chromosomiques (notamment délétions 17p et 11q), une augmentation de l'expression de *hTERT* et une diminution de la longueur des télomères et des niveaux d'expression de *TRF1*, *TRF2* et *POT1* ; le deuxième groupe est intermédiaire. Ces résultats confirment l'existence d'un lien entre statut télomérique et instabilité génomique au cours de la LLC et soulignent le rôle de la perte de *TP53* ou *ATM* dans cette dysfonction télomérique. L'altération du statut télomérique est par ailleurs associée à des caractéristiques de pronostic défavorable, comme l'absence de mutation des *IgV_H*, l'expression de *CD38* et le doublement rapide de la lymphocytose.

Enfin, nous avons évalué l'intérêt de la technique de MLPA pour la mise en évidence des anomalies cytogénétiques récurrentes à valeur pronostique de la LLC. Nous avons montré qu'il existe une bonne concordance entre la technique de référence et la MLPA, qui constitue une approche rapide et peu coûteuse pour la recherche d'anomalies génomiques présentes dans une majorité de cellules malignes. Nous avons cependant mis en évidence des cas intéressants de faux-positifs et de faux-négatifs avec la MLPA, indiquant que cette méthode ne peut pas remplacer les techniques classiques, mais constitue une approche complémentaire permettant une évaluation simultanée de divers déséquilibres.